

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)  
10 July 1999 (10.07.99)

International application No.  
PCT/DE98/03155

International filing date (day/month/year)  
27 October 1998 (27.10.98)

Applicant's or agent's file reference  
K 2607 - hu/msl

Priority date (day/month/year)  
27 October 1997 (27.10.97)

Applicant

NIEHRS, Christof et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
25 May 1999 (25.05.99)

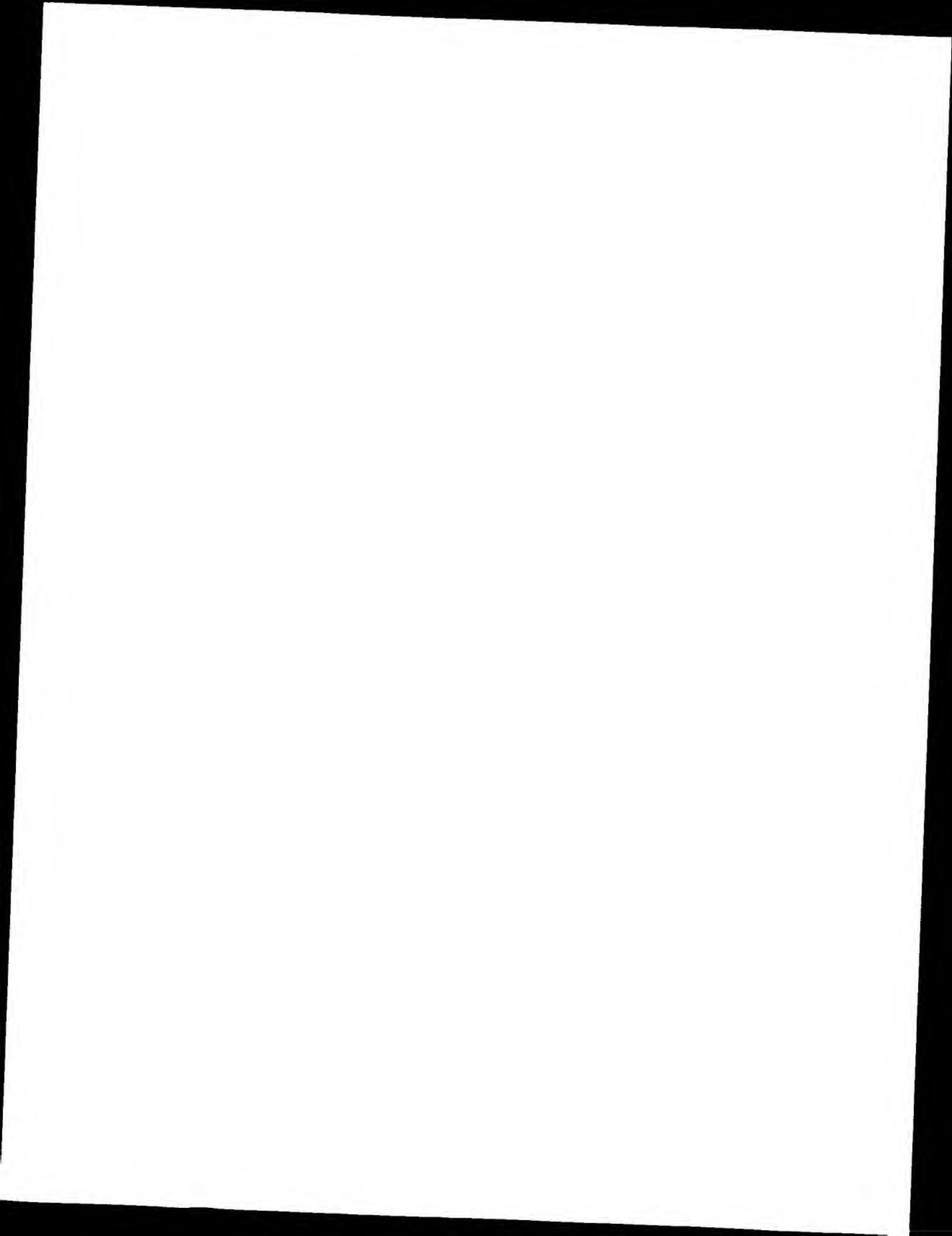
in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
\_\_\_\_\_

2. The election  was  
 was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

BEST AVAILABLE COPY

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer D. Barnes
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12N 15/18, C07K 14/475, 16/22, C12N 5/10, A61K 38/22, 48/00, G01N 33/53, C12Q 1/68</b>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/22000</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>6. Mai 1999 (06.05.99)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/DE98/03155</b>		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 27. Oktober 1998 (27.10.98)		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(30) Prioritätsdaten: 197 47 418.7 27. Oktober 1997 (27.10.97) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): NIEHRS, Christof [DE/DE]; Klingenteichstrasse 6b, D-69117 Heidelberg (DE). GLINKA, Andrei [RU/DE]; Erlenweg 22, D-69126 Heidelberg (DE).			
(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).			

(54) Title: INHIBITOR PROTEIN OF THE WNT SIGNAL PATHWAY

(54) Bezeichnung: INHIBITOR-PROTEIN DES WNT-SIGNALWEGS

(57) Abstract

An inhibitor protein of the wnt signal pathway, a DNA coding for such a protein and a process for preparing such a protein are disclosed, as well as the use of the DNA and protein and antibodies against said protein.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, eine ein solches Protein kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Proteins. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.

#### ***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

### Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, eine ein solches Protein kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Proteins. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.

5

Der wnt-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellproliferation und -Differenzierung während der Embryonal-Entwicklung von Drosophila, Xenopus laevis und der Maus. Der wnt-Signalweg umfaßt die Kombination von sekretorischen Glykoproteinen, die durch wnt-Gene, z.B. Xwnt-8, kodiert sind, und wnt-Rezeptoren, an die die Glykoproteine binden. Ferner ist der wnt-Signalweg beim Menschen kausal im Colon- und Mammakarzinom sowie dem Melanom impliziert (vgl. Peifer, M., Science 275, (1997), 1752-1753). Inhibitoren des wnt-Signalwegs könnten daher eine Möglichkeit darstellen, therapeutisch bei Tumorerkrankungen eingreifen zu können.

15

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem der wnt-Signalweg inhibiert werden kann.

20

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, wobei das Protein zumindest eine der in Fig. 1 angegebenen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II umfaßt.

25

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis des Anmelders, daß in Tieren, besonders Säugetieren, ganz besonders dem Menschen, ein Protein existiert, das den wnt-Signalweg inhibiert. Der Anmelder hat gefunden, daß die

- 2 -

5 Expression des wnt-Gens, Xwnt-8, in Xenopus laevis zur Ausbildung von Siamesischen Zwillingen führt. Diese Mißbildung wird verhindert, wenn gleichzeitig das vorstehende Protein exprimiert wird. Dieses Protein ist ein sekretorisches Protein von etwa 40 kD. Es weist zumindest eine der in Fig. 1 angegebenen Cysteinreichen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II auf. Varianten des Proteins sind in Form ihrer DNAs in Fig. 2 angegeben. Desweiteren hat der Anmelder erkannt, daß Varianten des Proteins in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden (vgl. Tabelle 1 und Fig. 3).

10 10 In der vorliegenden Erfindung wird vorstehendes Protein mit "wnt-Inhibitor" (wnt-I) bezeichnet.

15 15 In bevorzugter Ausführungsform weist (wnt-I) die in Fig. 1 angegebenen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II auf.

20 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine für (wnt-I) kodierende Nukleinsäure. Diese kann eine RNA oder eine DNA sein. Letztere kann z.B. eine genomische DNA oder eine cDNA sein. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

25

(a) die DNA von Fig. 2 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA,

(b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA, oder

25

(c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

30

Der Ausdruck "hybridisierende DNA" weist auf eine DNA hin, die unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA, mit einer DNA von (a) hybridisiert.

- 3 -

Die DNA von Fig. 2 umfaßt sieben DNAs, die aus *Xenopus laevis*, Maus, Mensch oder Huhn stammen und für (wnt-I) kodieren. Sechs dieser DNAs wurden bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) am 19. Sept. 1997 wie folgt hinterlegt:

5

- Fig. 2.1 (DNA aus Mensch) als phdkk-3 unter DSM 11762
- Fig. 2.2 (DNA aus Huhn) trägt die Bezeichnung pcdkk-3
- Fig. 2.3 (DNA aus Maus) als pmdkk-2 unter DSM 11759
- Fig. 2.4 (DNA aus Mensch) als phdkk-2 unter DSM 11761
- 10 Fig. 2.5 (DNA aus Maus) als pmdkk-1 unter DMS 11758
- Fig. 2.6 (DNA aus Mensch) als phdkk-1 unter DSM 11760
- Fig. 2.7 (DNA aus *Xenopus laevis*) als pRNdkk-1 unter DSM 11757

Nachstehend wird eine erfindungsgemäße DNA in Form einer cDNA beschrieben.

15

Diese steht beispielhaft für jede unter die vorliegende Erfindung fallende DNA.

20  
25

Zur Herstellung einer erfindungsgemäßen cDNA ist es günstig, von einer *Xenopus laevis*-cDNA-Bibliothek auszugehen (vgl. Glinka, A. et al., Mechanisms Develop. 60, (1996), 221-231). Von den einzelnen cDNA-Klonen werden mittels RNA-Polymerase entsprechende mRNAs synthetisiert. Diese werden zusammen mit mRNA von wnt-Genen, z.B. Xwnt-8, in *Xenopus laevis* mikroinjiziert. Es wird auf die Ausbildung von Siamesischen Zwillingen bei *Xenopus laevis* gescreent. Diese werden erhalten, wenn die mRNA des wnt-Gens alleine oder zusammen mit solcher *Xenopus laevis* mRNA mikroinjiziert wird, die nicht für (wnt-I) kodiert. Das Nicht-Auftreten von Siamesischen Zwillingen wird somit als Nachweis für das Vorliegen einer mRNA gewertet, die für (wnt-I) kodiert. Solch eine mRNA lässt unmittelbar die entsprechende cDNA erkennen.

30

Eine erfindungsgemäße cDNA kann in einem Vektor bzw. Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für *E. coli* sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu

- 4 -

nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4, anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

5      Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um eine, erfindungsgemäß, in einem Expressionsvektor vorliegende cDNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21 und SG 13009, den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae* und die tierischen Zellen L, 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und HeLa sowie die Insektenzellen sf9.

10

Der Fachmann weiß, in welcher Weise eine erfindungsgemäß cDNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese cDNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäß cDNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann.

15

Des weiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. trans- fizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäß cDNA exprimierte Protein zu isolieren und zu reinigen. Ein solches Protein, das auch ein Fusionsprotein sein kann, ist somit ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

20

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehen- des Protein bzw. Fusionsprotein gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem vorstehenden (Fusions)protein oder Fragmenten davon zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fu- sions)protein oder Fragmenten davon erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklo- nalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

25

30

- 5 -

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es, den wnt-Signalweg besser zu untersuchen und zu verstehen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann (wnt-I) in Organismen nachgewiesen werden. Ferner kann mit einem erfindungsgemäßen (wnt-I) ein gegen dieses Protein gerichteter Autoantikörper nachgewiesen werden. Beide Nachweise können durch übliche Verfahren, insbesondere einen Western Blot, einen ELISA, eine Immunpräzipitation oder durch Immunfluoreszenz, erfolgen. Des Weiteren kann mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA und hiervon abgeleiteten Primern, die Expression des für (wnt-I) kodierenden Gens nachgewiesen werden. Dieser Nachweis kann in üblicher Weise, insbesondere in einem Southern Blot, erfolgen.

Somit können mit der vorliegenden Erfindung auch Prozesse besser untersucht, d.h. diagnostiziert, und verstanden werden, die mit dem wnt-Signalweg zusammenhängen. Dies sind z.B. Zellproliferation und -Differenzierung sowie Erkrankungen verschiedenster Art. Beispiele von letzteren sind Erkrankungen des Auges und der Knochen sowie Tumorerkrankungen, insbesondere Colon- und Mammakarzinom sowie Melanom.

Des Weiteren eignet sich die vorliegende Erfindung, Maßnahmen für und gegen das Vorliegen von (wnt-I) in Organismen zu ergreifen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann (wnt-I) in Organismen inhibiert werden. Andererseits kann mit einem erfindungsgemäßen (wnt-I), insbesondere nach Kopplung an ein vom Körper nicht als fremd angesehenes Protein, z.B. Transferrin oder BSA, die Menge von (wnt-I) in Organismen erhöht werden. Entsprechendes kann auch mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA, erreicht werden, die unter die Kontrolle eines in bestimmten Geweben induzierbaren Promotors gestellt wird und nach ihrer Expression zur Bereitstellung von (wnt-I) in diesen Geweben führt. Darüber hinaus kann eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, insbesondere eine DNA, auch zur Inhibition von (wnt-I) genutzt werden. Hierzu wird die Nukleinsäure, z.B. als Basis für die Erstellung von Anti-Sinn-Oligonukleotiden zur Expressions-Inhibition des für (wnt-I) kodierenden Gens verwendet.

- 6 -

Somit stellt die vorliegende Erfindung auch die Möglichkeit bereit, in den wnt-Signalweg aktivierend bzw. inhibierend einzugreifen. Erstes könnte z.B durch Verabreichung eines erfindungsgemäßen Antikörpers gegen (wnt-I) erfolgen. Für letzteres bietet sich an, erfindungsgemäßes (wnt-I) zu verabreichen. Die Aktivierung des wnt-Signalwegs könnte sinnvoll sein, wenn daran gedacht wird, Organismen für Organspende zu züchten. Die Inhibierung des wnt-Signalwegs bietet sich allerdings an, um therapeutisch bei Erkrankungen von Knochen und des Auges sowie bei Tumorerkrankungen, insbesondere Colon- und Mammakarzinomen sowie Melanom, eingreifen zu können.

10

Insbesondere zeichnet sich die vorliegende Erfindung dadurch aus, daß sie gewebespezifisch eingesetzt werden kann. Dies gilt sowohl für Diagnose als auch für Therapie. Beispielsweise eignet sich eine erfindungsgemäße DNA, DKK-1, ein entsprechendes Protein bzw. ein Antikörper davon besonders für Gewebe, wie Gehirn, Herz, Gefäße, Knochen, Knorpel, Bindegewebe und Auge. Ferner eignet sich eine erfindungsgemäße DNA, DKK-2, ein entsprechendes Protein bzw. ein Antikörper davon besonders für Gewebe, wie Gehirn, Herz, Gefäße, Knochen, Bindegewebe, Nieren, Hoden, Milz, Ovarien, Muskel, Uterus, Knorpel, Auge und Brustdrüse. Des Weiteren eignet sich eine erfindungsgemäße DNA, DKK-3, ein entsprechendes Protein bzw. ein Antikörper davon, besonders für Gewebe, wie Gehirn, Herz, Gefäße, Knochen, Knorpel, Auge, Bindegewebe, Lunge, Ovarien, Muskel und Brustdrüse.

20

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

25

Fig. 1 zeigt die Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II eines erfindungsgemäßen (wnt-I). Die Angabe "-" bedeutet eine Aminosäure, wobei die Zahl der Aminosäuren variabel ist, wenn sie einen Stern aufweisen,

30

Fig. 2 zeigt die Basensequenz von sieben (wnt-I) kodierenden DNAs mit Angabe der Basen, die zu den Aminosäure-Konsensus-Sequenzen

- 7 -

von (wnt-I) beitragen.

Fig. 3 zeigt die Expression von drei (wnt-I) kodierenden DNAs, DKK-1, DKK-2 und DKK-3, in Geweben.

5

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

**Beispiel 1: Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen (wnt-I)**

Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen (wnt-I) wurde die DNA von Fig. 2.6,

10 phdkk-1 mit Bam HI-Linkern versehen, anschließend mit Bam HI gespalten und in den mit Bam HI gespaltenen Expressionsvektors pQE-8 (Qiagen) inseriert. Es wurde das Expressionsplasmid pQ/wnt-I erhalten. Ein solches kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner) und einem erfindungsgemäßen (wnt-I) (C-Terminuspartner). pQ/wnt-I wurde zur Transformation von 15 E.coli SG 13009(vgl. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) verwendet. Die Bakterien wurden in einem LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin und 25µg/ml Kanamycin kultiviert und 4 h mit 60µM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wurde eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wurde mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend der Angaben des Herstellers (Diagen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wurde in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wurde das Fusionsprotein einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, 20 J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).

25

Es zeigte sich, daß ein erfindungsgemäßes (Fusions)protein in hochreiner Form hergestellt werden kann.

30

**Beispiel 2: Herstellung und Nachweis eines erfindungsgemäßen Antikörpers**

Ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 wurde einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M

- 8 -

Natriumacetat wurde eine ca. 40 kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke wurden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgte, bestimmt wurde. Mit dem Gel-gereinigten Fusionsprotein wurden Tiere wie folgt immunisiert:

**Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen**

Pro Immunisierung wurden 35 $\mu$ g Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS

10 und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)

Tag 14: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)

Tag 28: 3. Immunisierung (icFA)

Tag 56: 4. Immunisierung (icFA)

15 Tag 80: Ausbluten

Das Serum des Kaninchens wurde im Immunoblot getestet. Hierzu wurde ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl.

20 Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die Western Blot-Analyse wurde wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wurde das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper war das Serum des Kaninchens (1:10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten

25 mit PBS wurde das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper war ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1:5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgten mehrere Waschschritte mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung

30 (36 $\mu$ M 5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400 $\mu$ M Nitroblau-tetrazolium, 100mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar waren.

- 9 -

Es zeigte sich, daß erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.

**Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn**

5 Pro Immunisierung wurden 40 $\mu$ g Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)

Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)

10 Tag 50: 3. Immunisierung (icFA)

Aus Eigelb wurden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es wurden erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

15 **Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus**

Pro Immunisierung wurden 12 $\mu$ g Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung war das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

20 Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)

Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)

Tag 56: 3. Immunisierung (icFA)

Tag 84: 4. Immunisierung (PBS)

Tag 87: Fusion

25

Überstände von Hybridomen wurden im Western Blot getestet. Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper wurden nachgewiesen.

30

- 10 -

Tabelle 1: Expression von erfassungsgemäßen DNAs in Mausembryonen

	Dkk-1	Dkk-2	Dkk-3
<b>Neuroepithelium</b>			
E9.5 diencephalon	+++ ventral	+++ medial	+ medial
E12.5	telencephalon M/mantle	hypothalamus	telencephalon M/ ventricular zone
Eye	pigmented epithelium	choroid	retina
Spinal cord	-/+	-	ventricular zone Roof plate
<b>Mesoderm:</b>			
Heart E10	bulbus cordis Endocardium	endothelium	myocardium
	septum transversum		
Heart E12	endocardial cushion	endothelium	endocardial cushion
Blood vessels	+++ aorta	+++ pulmonary artery	+++ aorta + pulmonary artery
Limb bud mesenchyme	E9	S	I
Bone E12	perichondrium	S /mesenchyme	D perichondrium /mesenchyme

- 11 -

Bone E15	Ossification centers	-
Urogenital	nephric duct S-shaped body Comma shaped body	metanephric mesenchyme
Palate	+++	++
Hair follicle	+++ mesenchyme + epithelium	+
Tooth mesenchyme	-	-
Trunk mesoderm	+/-	+++

Legende: Mesoderm: (D) deep, (I) intermediate (L) lateral, (M) medial, (S) superficial.  
 Expressionshöhe: (-) absence, (+/-) very weak expression, (+) medium, (+-) strong, (+++) very strong.

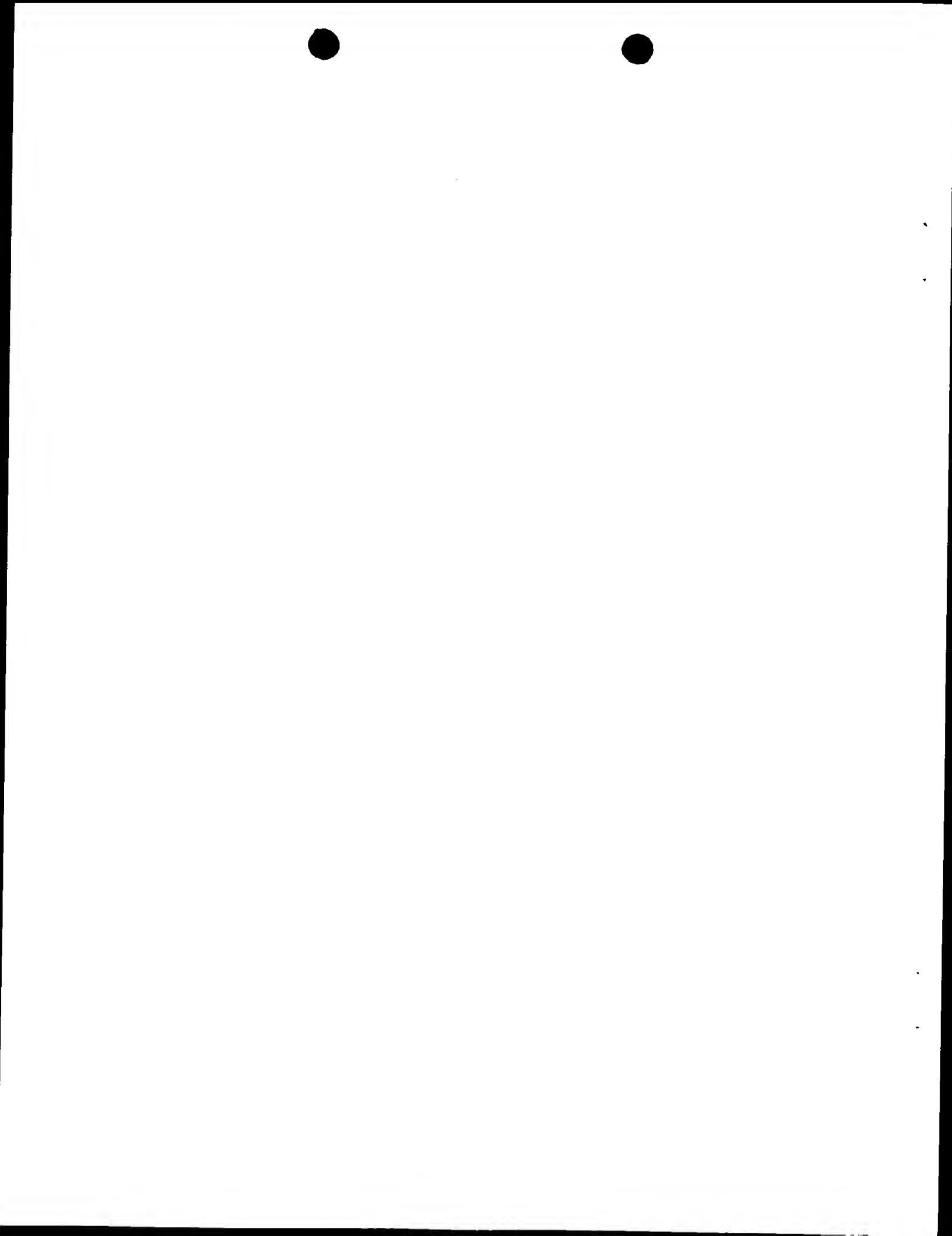
- 12 -

**Patentansprüche**

- 5        1. Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, wobei das Protein zumindest eine der in Fig. 1 angegebenen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II umfaßt.
- 10      2. Protein nach Anspruch 1, wobei das Protein die Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II umfaßt.
- 15      3. DNA, kodierend für das Protein nach Anspruch 1 oder 2.
- 20      4. DNA nach Anspruch 3, wobei die DNA umfaßt:
  - (a) die DNA von Fig. 2 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA,
  - (b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA oder
  - (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.
- 25      5. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 3 oder 4.
- 30      6. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 5.
7. Verfahren zur Herstellung des Proteins nach Anspruch 1 oder 2, umfassend die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 6 unter geeigneten Bedingungen.
8. Antikörper, gerichtet gegen das Protein nach Anspruch 1 oder 2.
9. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 oder 2 als Reagens zur Diagnose und/oder Therapie.

- 13 -

10. Verwendung der DNA nach Anspruch 3 oder 4 als Reagens zur Diagnose und/oder Therapie.



1/11

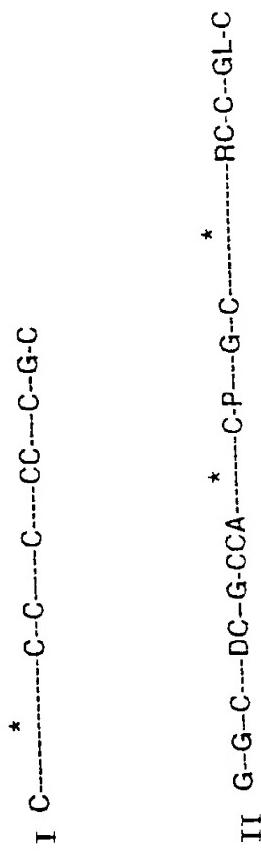
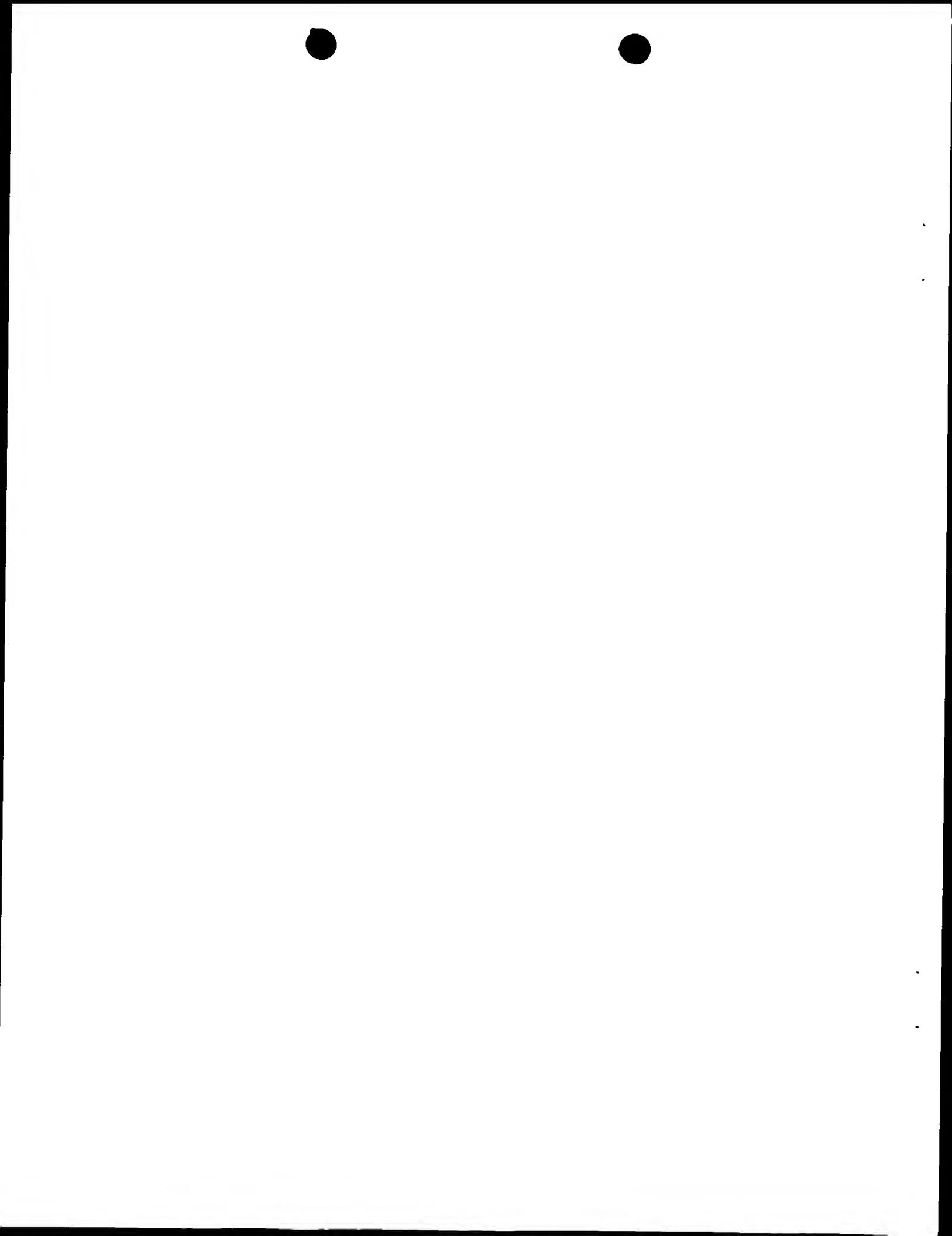


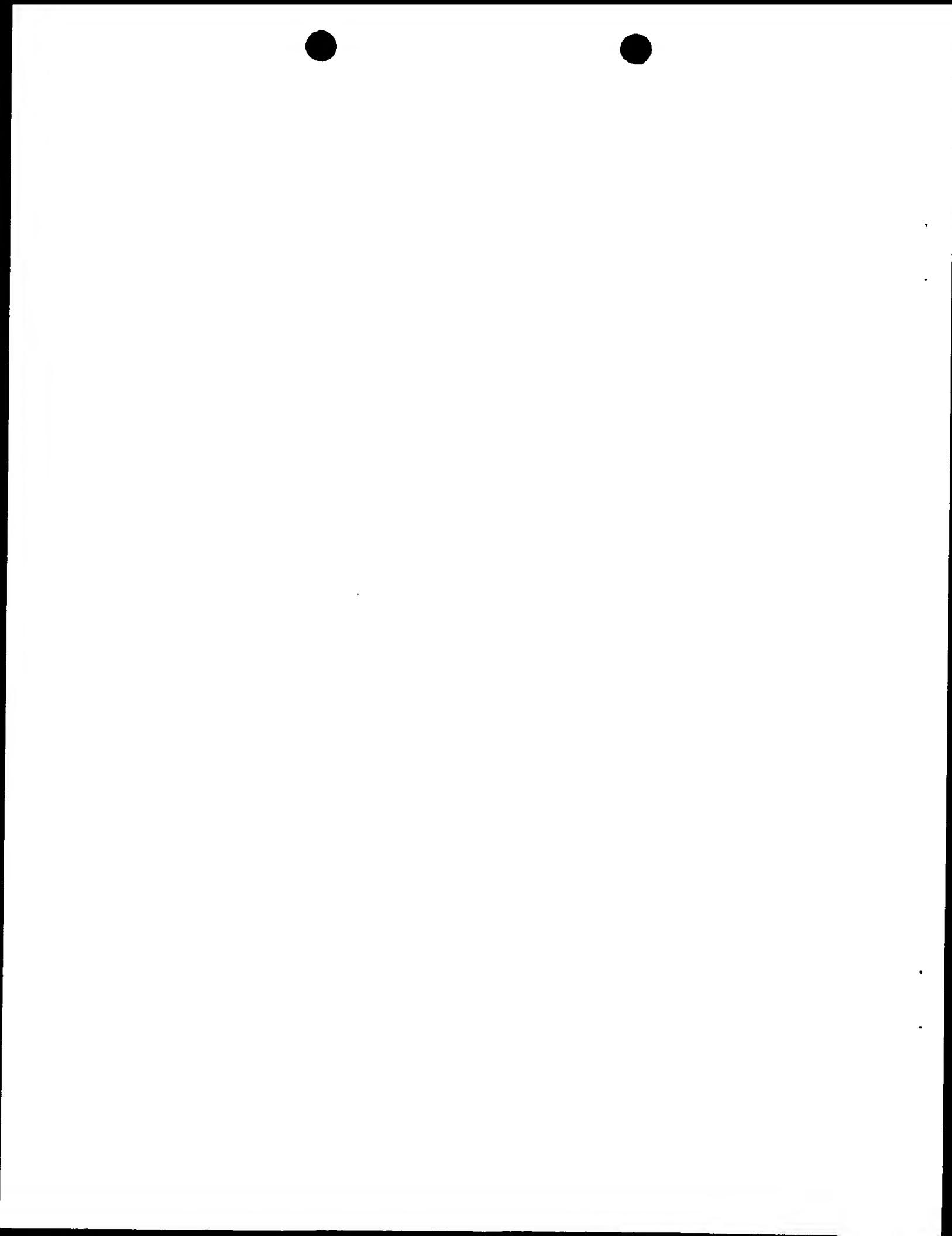
Fig. 1



2/11

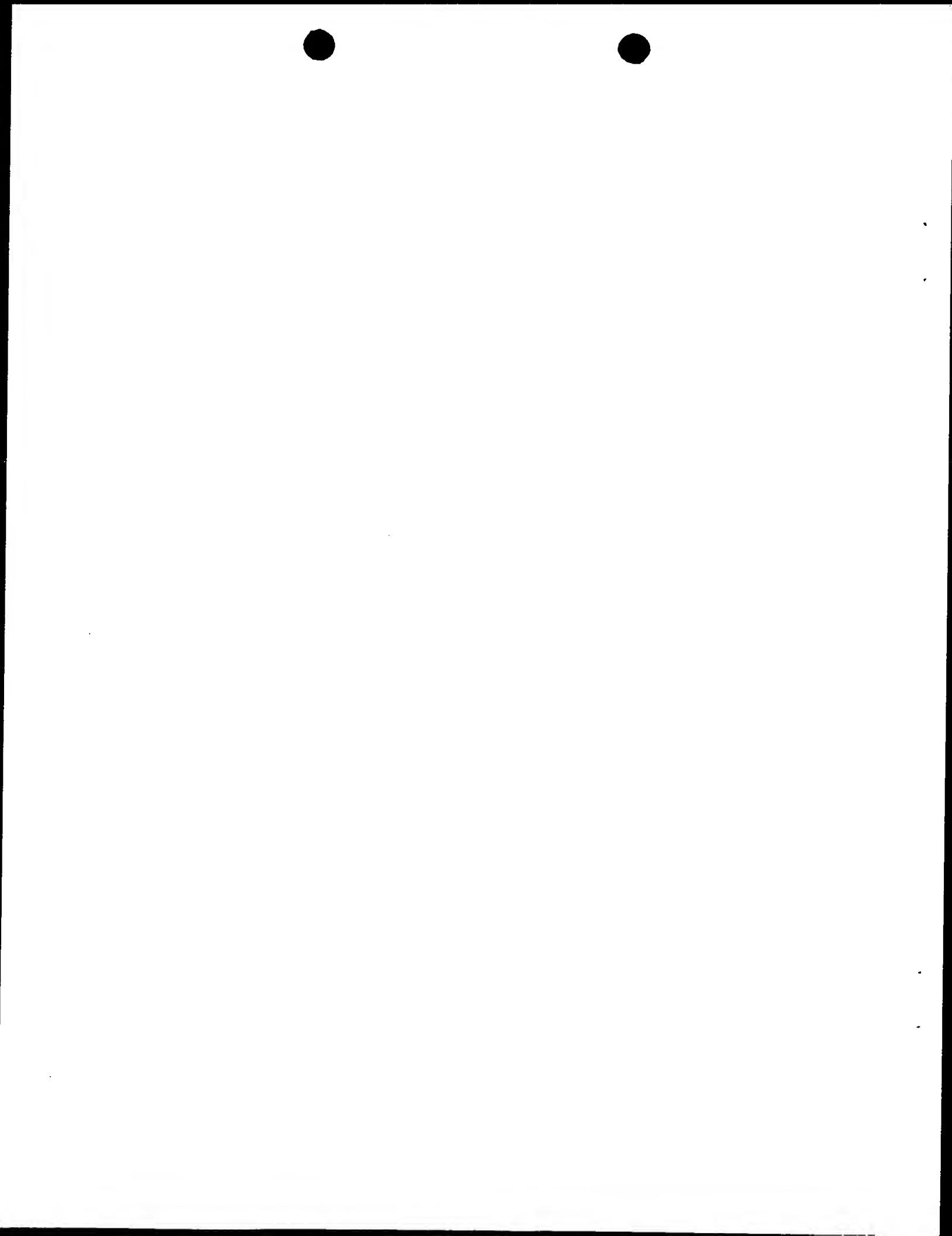
13	GCTCTAGAATAGTGGATCCCCGGGGCTGCAGGAAATTCCGGCACGAGC66C16C0G6C6CAG	phdtk-3
1	.....	pcdk-3
1	.....	pmdkk-2
1	.....	phdtk-2
1	.....	pmdkk-1
1	.....	phdtk-1
1	.....	phdtkk-1

2



3/11

Fig. 2 (Forts.)



4/11

Fig. 2 (Forts.).

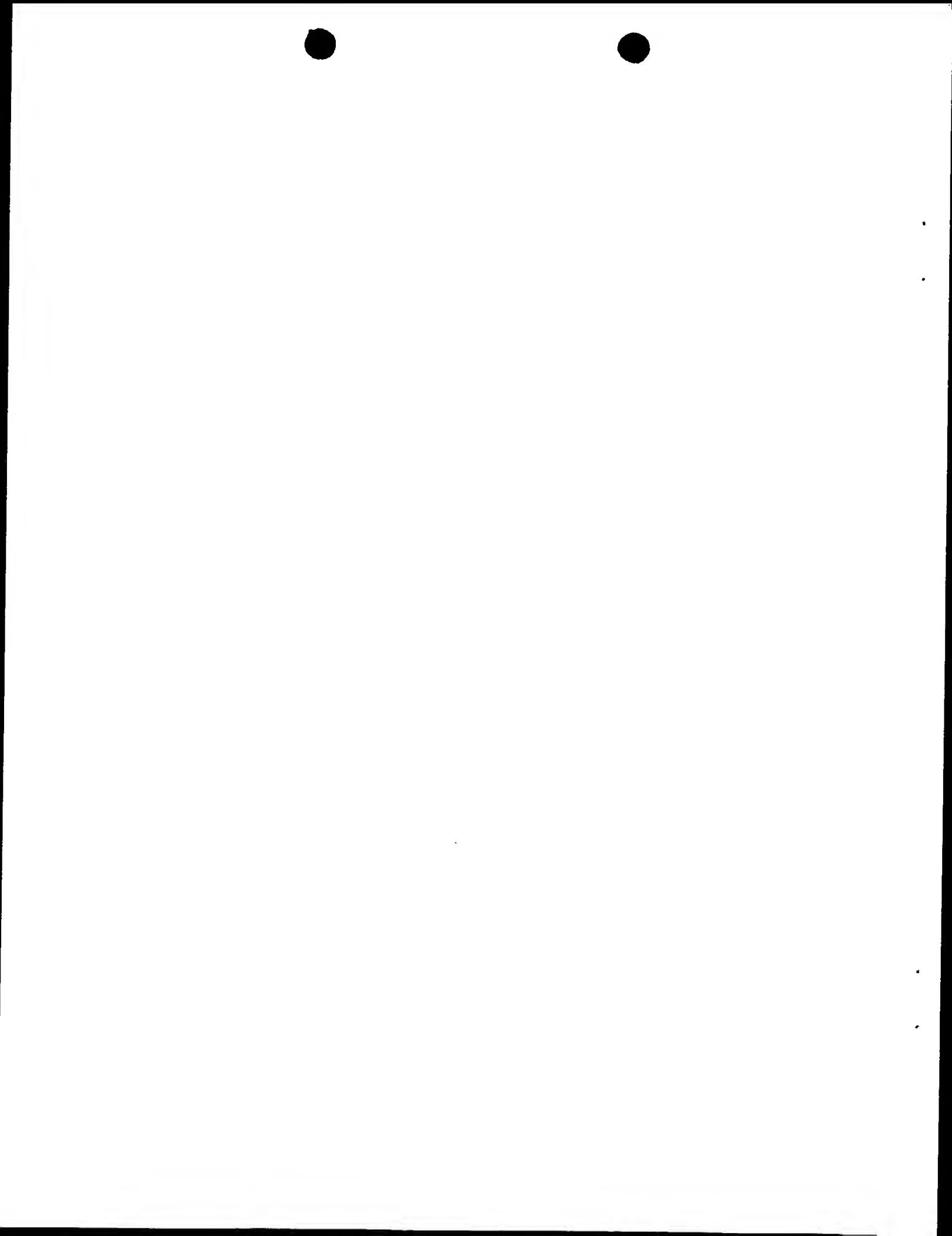
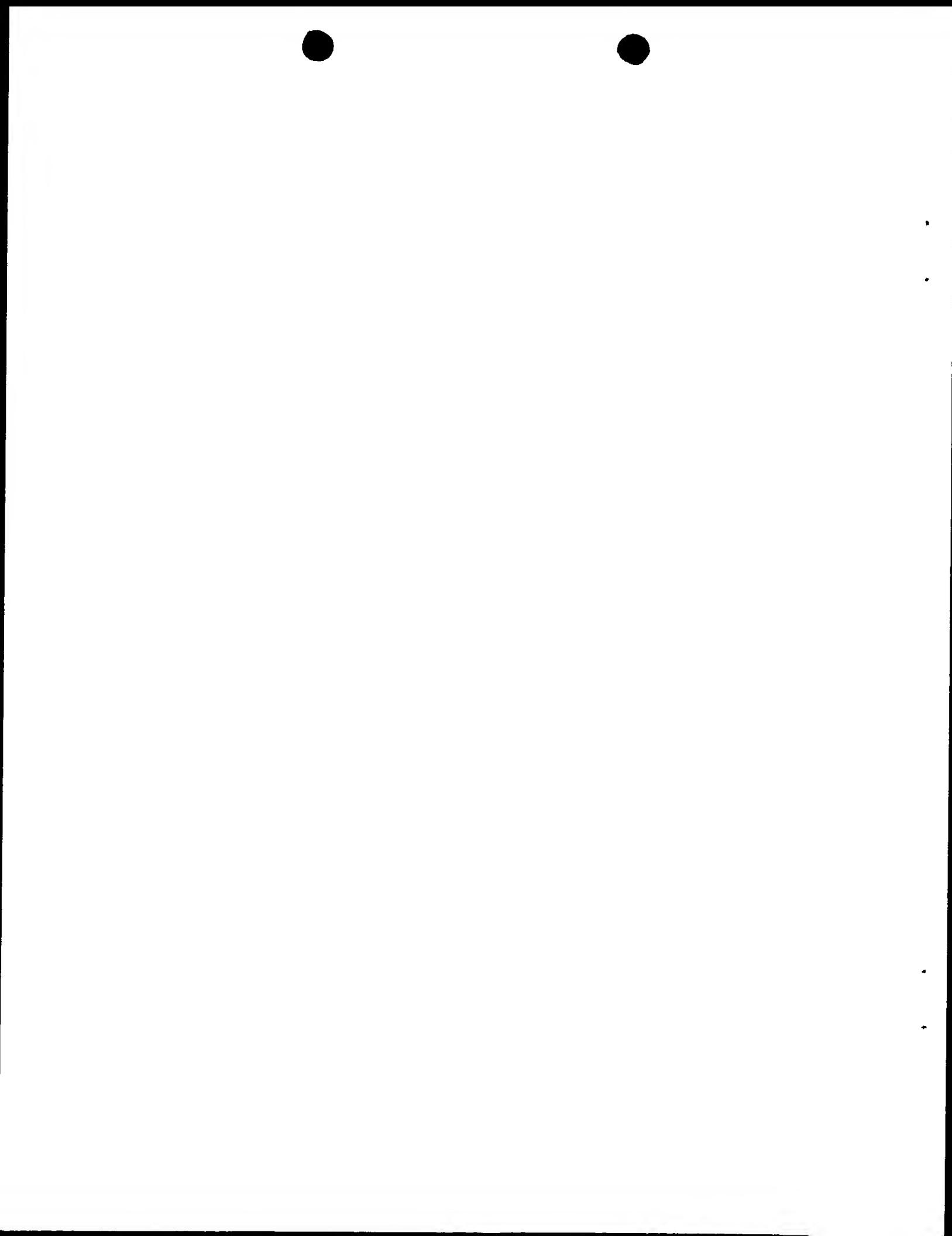
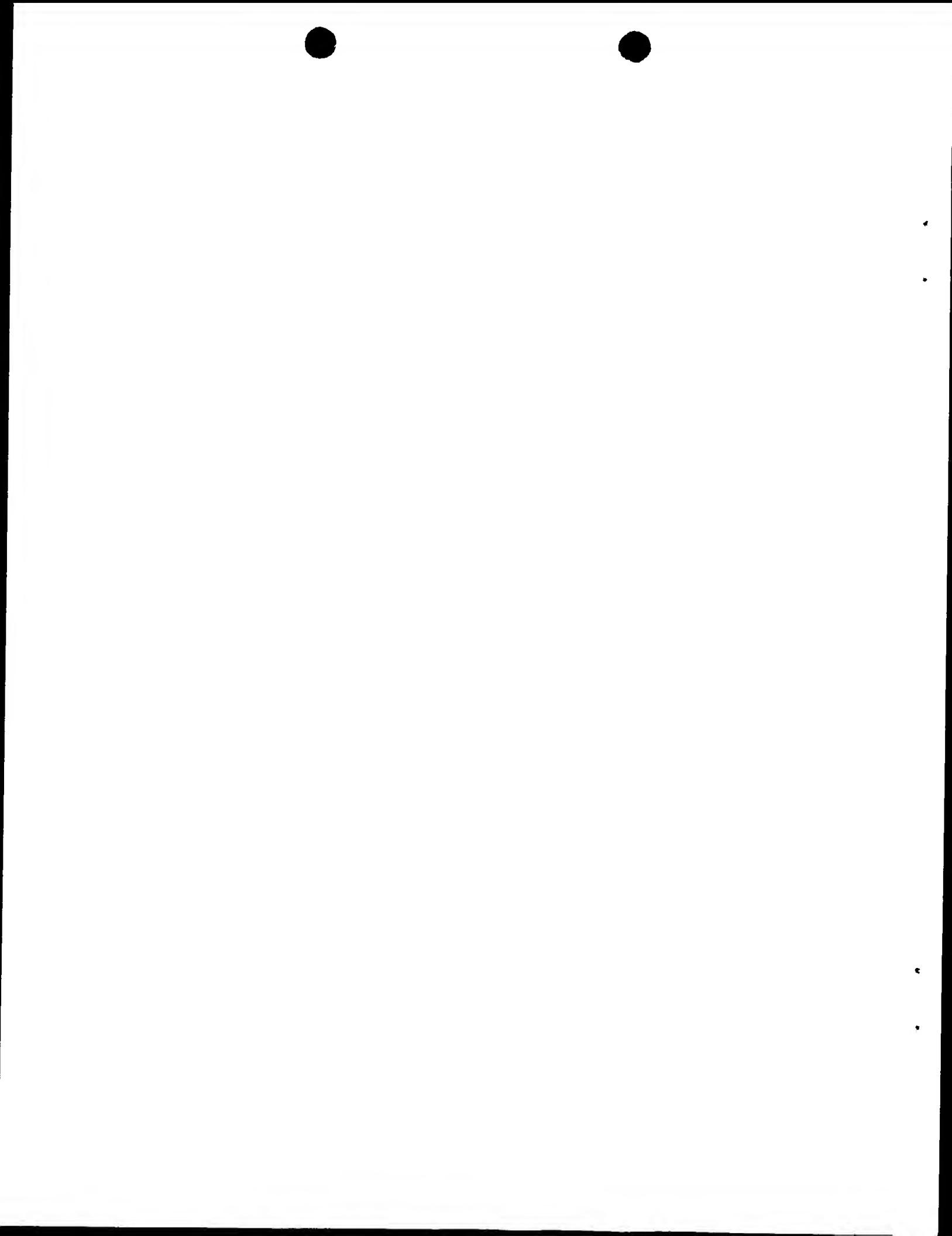


Fig. 2 (Forts.)



433	CCACTTAAAGGAGAAAAT	6.6TACCA	GAGAACCAACAA16ACI	CCCAGGA	phdkk-3
604	TCTGGCAAAACCAAGTC	6666A	AGTCG	GG66TTC6C	pcdkk-3
445	TCTGC	6666A	AGTCG	GG66TTC6C	pmdkk-2
406	TCTGC	6666A	AGTCG	GG66TTC6C	phdkk-2
680	TCTg	6666T	AGTCG	GG66TTC6C	pmdkk-1
653	TCTG	6666T	AGTCG	GG66TTC6C	phdkk-1
703	TCTGC	6666T	AGTCG	GG66TTC6C	pRNdkk-1
433	Ac6666CT6666CT6666C	AGAA	ACI	GG66TTC6C	phdkk-3
663	Ac6666CT6666CT6666C	AGAA	ACI	GG66TTC6C	pcdkk-3
505	Ac6666CT6666CT6666C	AGAA	ACI	GG66TTC6C	pmdkk-2
466	Ac6666CT6666CT6666C	AGAA	ACI	GG66TTC6C	phdkk-2
740	Ac6666CT6666CT6666C	AGAA	ACI	GG66TTC6C	pmdkk-1
713	Ac6666CT6666CT6666C	AGAA	ACI	GG66TTC6C	phdkk-1
763	Ac6666CT6666CT6666C	AGAA	ACI	GG66TTC6C	pRNdkk-1
433	66TGAA	CCATGAT	TCTCAAC	GG66TTC6C	phdkk-3
723	66TGAA	CCATGAT	TCTCAAC	GG66TTC6C	pcdkk-3
565	AAGATGCC	CCATGAT	TCTCAAC	GG66TTC6C	pmdkk-2
526	AAGATGCC	CCATGAT	TCTCAAC	GG66TTC6C	phdkk-2
800	AAGATCA	CCATCA	TCTCAAC	GG66TTC6C	pmdkk-1
773	AAGATCA	CCATCA	TCTCAAC	GG66TTC6C	phdkk-1
823	AAGAGAA	TTTACACTG	TCTCAAC	GG66TTC6C	pRNdkk-1

Fig. 2 (Forts.)

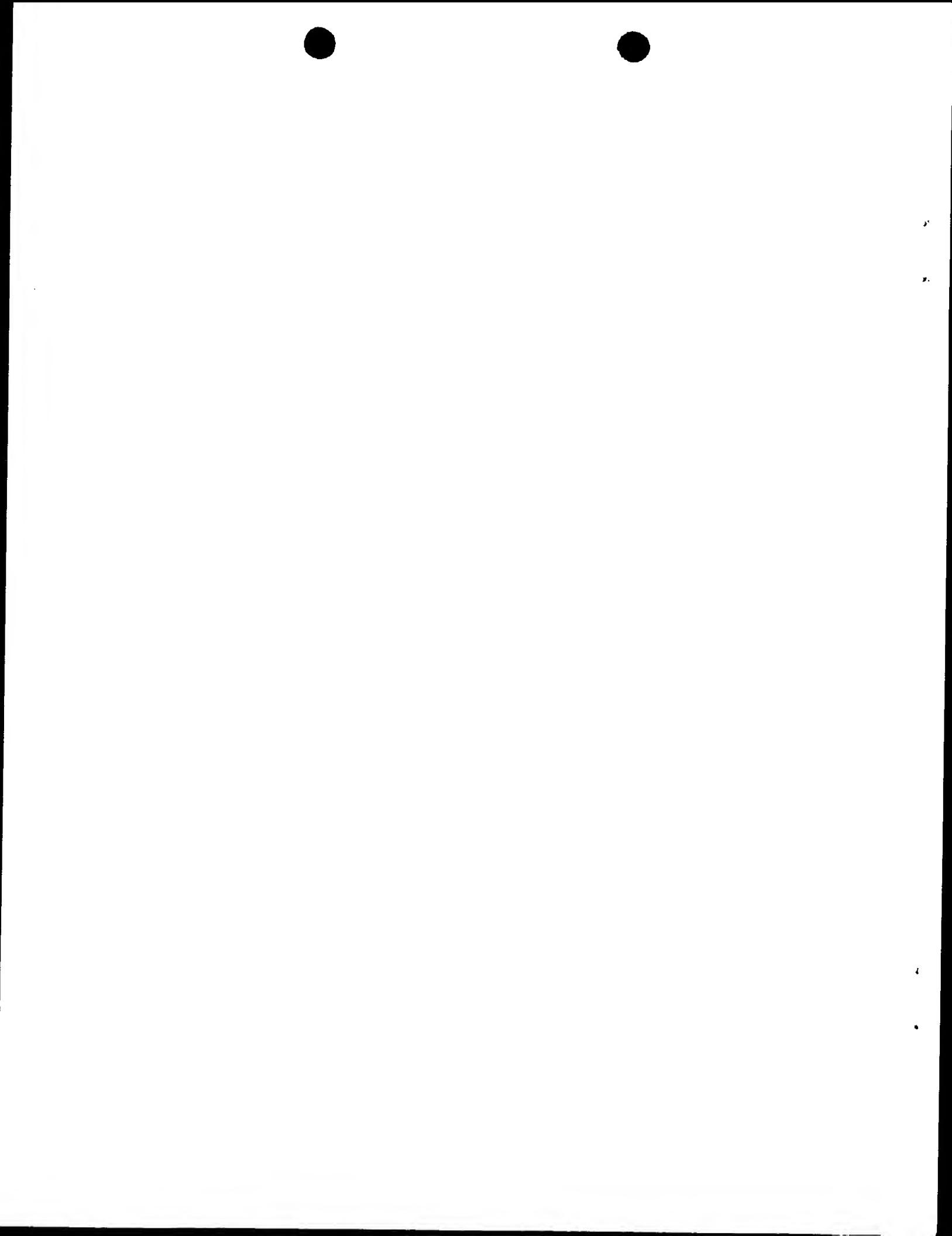


7/11

433	CC <del>TGATGGAGTACTAGAGCC</del> <u>G</u> CCCAGTGCAAGTGCTTGAI <u>C</u> GCCAACCTCAGAGC
703	AAACACTGGAAGAGTCATCACTAGCAGACTGTGAAATTGTTGATI <u>A</u> AAIGCASTATGGC
619	GGATTGAGAACATCAATTGCAGACTGAAAGTGAGCTTGAAAGTGTGIA <u>C</u> TAAGCATTAAAGC
580	ACCGACAGIC..AAAATGAGGGACTCTTTATCTAAAT <u>A</u> ATGCTACGAAATA <u>C</u>
856	CCGAGGCTACAGAG..CCCTGAGGACCTCTCTAAATTAA <u>C</u> TAAGACCTTGGTAA <u>C</u>
829	CCGAGGCTACAGAG..CCCTGAGGACCTCTCTAAATTAA <u>C</u> TAAGACCTTGGTAA <u>C</u>
883	CCGAGGCTACAGAG..CCCTGAGGACCTCTCTAAATTAA <u>C</u> TAAGACCTTGGTAA <u>C</u>

433	AGCCACAGTACTACATC	161616AACTGTCCTCCATTGAAACCAAGGA	A	AAA	phdtk-3
843	ATGAGGGAAACCTGGATTGGAAATGCGGGAAATGAGGAATG	G	GGG	TGGAAAGAGAATG	pcdkk-3
678	AAGGAAAGGAAAGGAAATGCGGGAAATGAGGAATG	A	GGG	GGGAAAGAGAATG	pmdkk-2
640	AAGGAAAGGAAAGGAAATGCGGGAAATGAGGAATG	T	GGG	GGGAAAGAGAATG	phdtk-2
910	CTTATGATTGTCAAGCTCATCCCCAGGATCAGAATCTAG	A	TTA	AGCAT	pmdkk-1
829	CTGCAAGTAAATTCAGTTACATGAAAGTGGCCTTCCC	C	GGG	GGGAAAGAGAATG	phdtk-1
941	CTGCAAGTAAATTCAGTTACATGAAAGTGGCCTTCCC	G	GGG	GGGAAAGAGAATG	prRNdtk-1

Fig. 2 (Forts.)



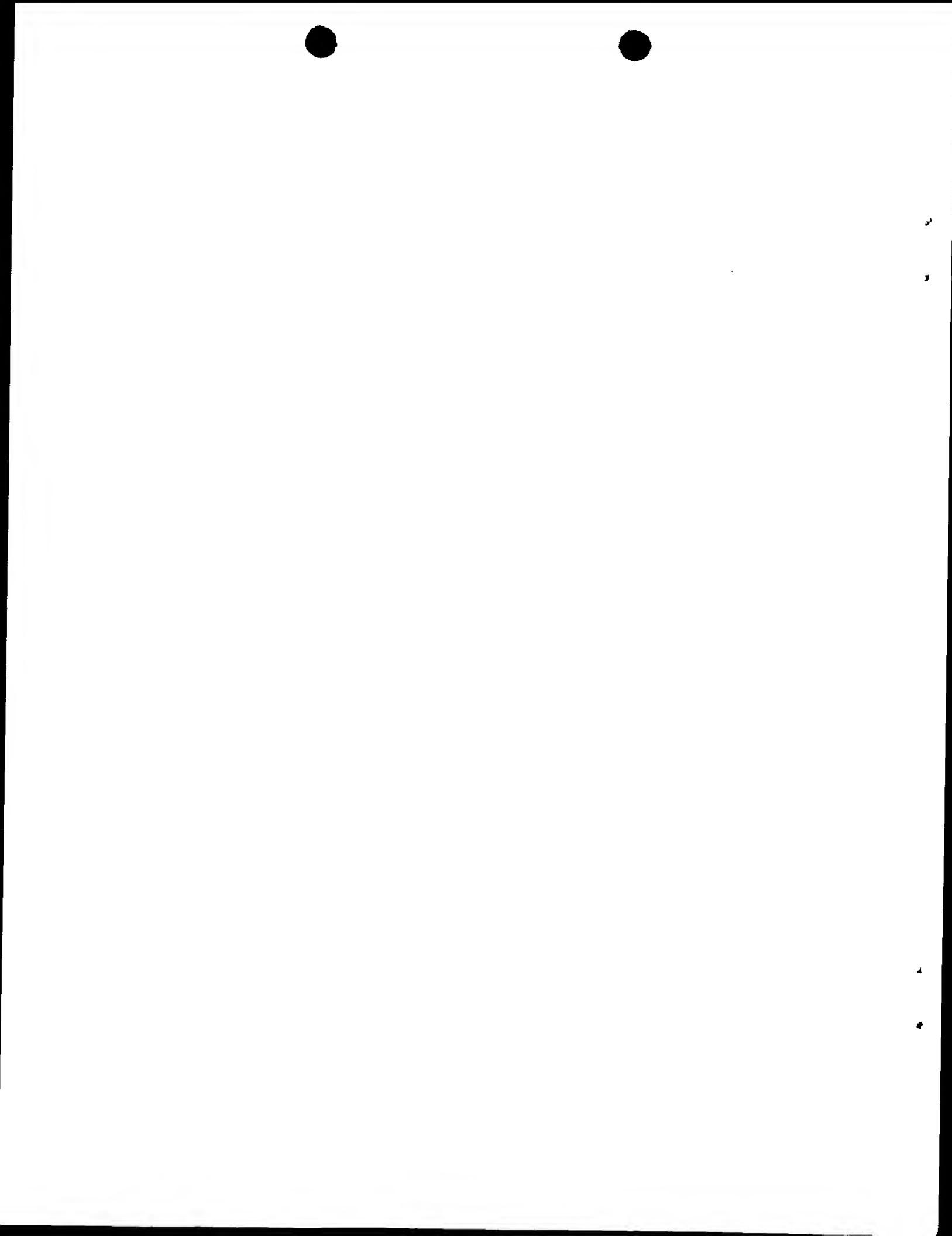
8/11

433     . . . . .  
 963 TCTGATTACGAAAGCAAGCGTCATTCAGGAAGTGC6TAAGAAATAGAAAAGCTGGAG  
 798 TTATGTGCCTCATCTAATGACACATTGAAATGCTATTAAGAAA  
 757 GTGAGGGTTAAT  
 1030 CTGTTGATTGAGTAAATTACTGTTGTTAAATCCTCAgTGTGGCACTTACCTGTAAATGC  
 829     . . . . .  
 1061 1GTTGTAATACTACGCCAAGGAGACCIGTTAAACGIAAAAACCCGIGTAAAGTGA

433     . . . . .  
 1023 GACCAAGCAGGTGTAAGCTGAGCATGACCCGGCTCATGACCTAATCTGGGAGATGAA  
 850 AGCACACCATGGAAATTACAAAAA  
 769     . . . . .  
 1090 AgCAAACCTTTATTATTTCTCTAGAG6T6TgTACATTGCCCTGTTCTCTGCAATG  
 829     . . . . .  
 1121 TACATGATCCTCTCTAATGAACTGACCTGTCACATTCCGACGCCCTCTCCCTT

433     . . . . .  
 1083 ATATGAAAGTTCAAAACACCAAGTTAAGTTA61CCTAGAAAATGTTGCTTCACTGCTTA  
 882     . . . . .  
 769     . . . . .  
 1150 gAAATTCTTGTAGCAGG6T1GAI1GTCATGAAATACCTCAAAATCTAAATGAAAGTaa  
 829     . . . . .  
 1181 TATATATATAATATAATATAATGAAAGTTACCGCTCTAATGTTA1GTC

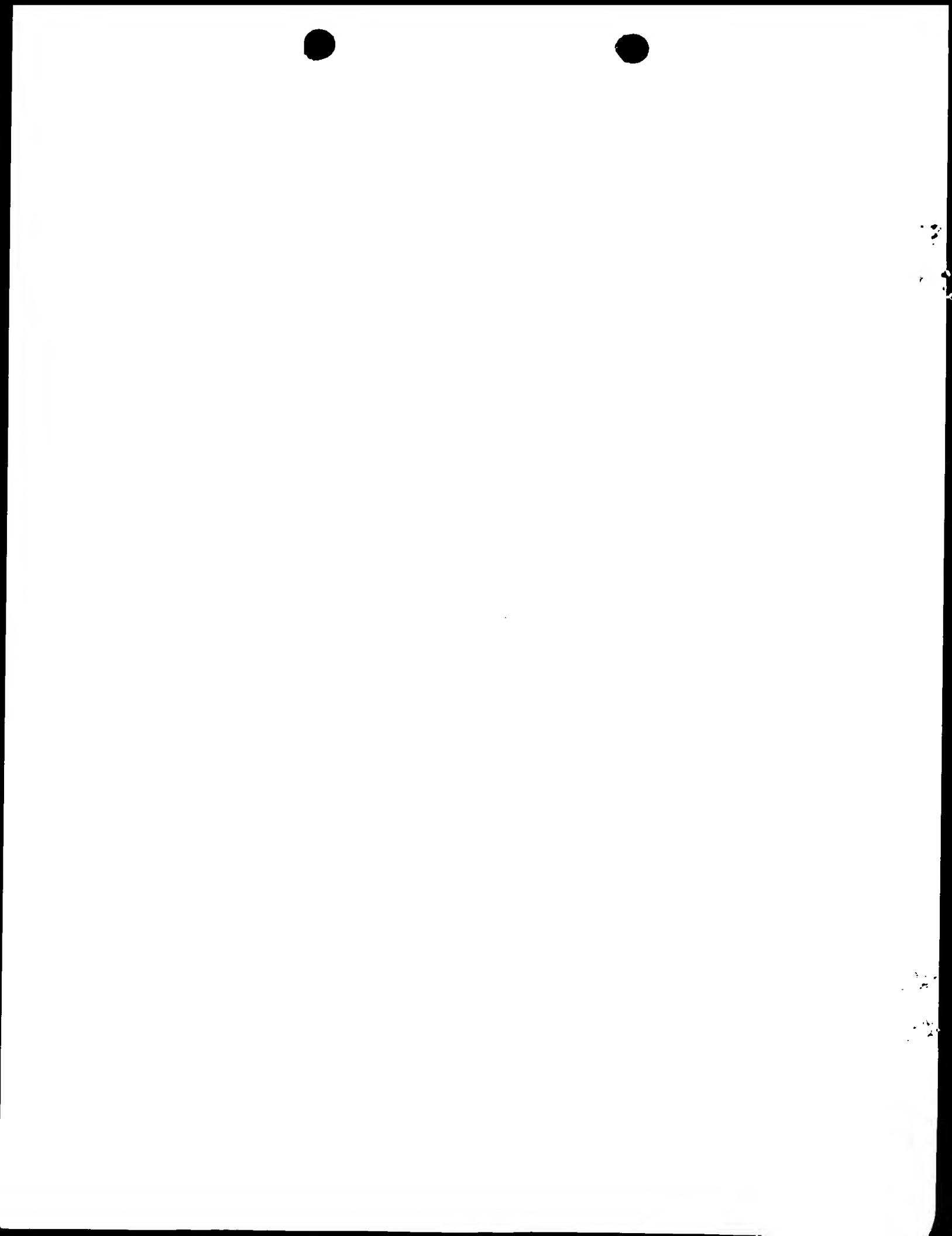
Fig. 2 (Forts.)



433	CAUACACCCTTAAAGATACTTGATGAACTGGAACTTAAACATTCATTGAGCATCC
1143	.....
982	.....
769	.....
1210	AAAAAAA.....
829	.....
1241	ATTTTAAATGAAAIAAACATTCTCAACCTTAAACATTAACAAAAAA.....

433	1203	GTTTCCACCAACCTGAAAGTCAATGGATTACAGTCATCCTTGACCC
434	802	-
435	769	-
436	1227	-
437	629	-
438	1298	-
439	455	-
440	456	-
441	457	-
442	458	-
443	459	-
444	460	-
445	461	-
446	462	-
447	463	-
448	464	-
449	465	-
450	466	-
451	467	-
452	468	-
453	469	-
454	470	-
455	471	-
456	472	-
457	473	-
458	474	-
459	475	-
460	476	-
461	477	-
462	478	-
463	479	-
464	480	-
465	481	-
466	482	-
467	483	-
468	484	-
469	485	-
470	486	-
471	487	-
472	488	-
473	489	-
474	490	-
475	491	-
476	492	-
477	493	-
478	494	-
479	495	-
480	496	-
481	497	-
482	498	-
483	499	-
484	500	-
485	501	-
486	502	-
487	503	-
488	504	-
489	505	-
490	506	-
491	507	-
492	508	-
493	509	-
494	510	-
495	511	-
496	512	-
497	513	-
498	514	-
499	515	-
500	516	-
501	517	-
502	518	-
503	519	-
504	520	-
505	521	-
506	522	-
507	523	-
508	524	-
509	525	-
510	526	-
511	527	-
512	528	-
513	529	-
514	530	-
515	531	-
516	532	-
517	533	-
518	534	-
519	535	-
520	536	-
521	537	-
522	538	-
523	539	-
524	540	-
525	541	-
526	542	-
527	543	-
528	544	-
529	545	-
530	546	-
531	547	-
532	548	-
533	549	-
534	550	-
535	551	-
536	552	-
537	553	-
538	554	-
539	555	-
540	556	-
541	557	-
542	558	-
543	559	-
544	560	-
545	561	-
546	562	-
547	563	-
548	564	-
549	565	-
550	566	-
551	567	-
552	568	-
553	569	-
554	570	-
555	571	-
556	572	-
557	573	-
558	574	-
559	575	-
560	576	-
561	577	-
562	578	-
563	579	-
564	580	-
565	581	-
566	582	-
567	583	-
568	584	-
569	585	-
570	586	-
571	587	-
572	588	-
573	589	-
574	590	-
575	591	-
576	592	-
577	593	-
578	594	-
579	595	-
580	596	-
581	597	-
582	598	-
583	599	-
584	600	-
585	601	-
586	602	-
587	603	-
588	604	-
589	605	-
590	606	-
591	607	-
592	608	-
593	609	-
594	610	-
595	611	-
596	612	-
597	613	-
598	614	-
599	615	-
600	616	-
601	617	-
602	618	-
603	619	-
604	620	-
605	621	-
606	622	-
607	623	-
608	624	-
609	625	-
610	626	-
611	627	-
612	628	-
613	629	-
614	630	-
615	631	-
616	632	-
617	633	-
618	634	-
619	635	-
620	636	-
621	637	-
622	638	-
623	639	-
624	640	-
625	641	-
626	642	-
627	643	-
628	644	-
629	645	-
630	646	-
631	647	-
632	648	-
633	649	-
634	650	-
635	651	-
636	652	-
637	653	-
638	654	-
639	655	-
640	656	-
641	657	-
642	658	-
643	659	-
644	660	-
645	661	-
646	662	-
647	663	-
648	664	-
649	665	-
650	666	-
651	667	-
652	668	-
653	669	-
654	670	-
655	671	-
656	672	-
657	673	-
658	674	-
659	675	-
660	676	-
661	677	-
662	678	-
663	679	-
664	680	-
665	681	-
666	682	-
667	683	-
668	684	-
669	685	-
670	686	-
671	687	-
672	688	-
673	689	-
674	690	-
675	691	-
676	692	-
677	693	-
678	694	-
679	695	-
680	696	-
681	697	-
682	698	-
683	699	-
684	700	-
685	701	-
686	702	-
687	703	-
688	704	-
689	705	-
690	706	-
691	707	-
692	708	-
693	709	-
694	710	-
695	711	-
696	712	-
697	713	-
698	714	-
699	715	-
700	716	-
701	717	-
702	718	-
703	719	-
704	720	-
705	721	-
706	722	-
707	723	-
708	724	-
709	725	-
710	726	-
711	727	-
712	728	-
713	729	-
714	730	-
715	731	-
716	732	-
717	733	-
718	734	-
719	735	-
720	736	-
721	737	-
722	738	-
723	739	-
724	740	-
725	741	-
726	742	-
727	743	-
728	744	-
729	745	-
730	746	-
731	747	-
732	748	-
733	749	-
734	750	-
735	751	-
736	752	-
737	753	-
738	754	-
739	755	-
740	756	-
741	757	-
742	758	-
743	759	-
744	760	-
745	761	-
746	762	-
747	763	-
748	764	-
749	765	-
750	766	-
751	767	-
752	768	-
753	769	-
754	770	-
755	771	-
756	772	-
757	773	-
758	774	-
759	775	-
760	776	-
761	777	-
762	778	-
763	779	-
764	780	-
765	781	-
766	782	-
767	783	-
768	784	-
769	785	-
770	786	-
771	787	-
772	788	-
773	789	-
774	790	-
775	791	-
776	792	-
777	793	-
778	794	-
779	795	-
780	796	-
781	797	-
782	798	-
783	799	-
784	800	-
785	801	-
786	802	-
787	803	-
788	804	-
789	805	-
790	806	-
791	807	-
792	808	-
793	809	-
794	810	-
795	811	-
796	812	-
797	813	-
798	814	-
799	815	-
800	816	-
786	817	-
787	818	-
788	819	-
789	820	-
790	821	-
791	822	-
792	823	-
793	824	-
794	825	-
795	826	-
796	827	-
797	828	-
798	829	-
799	830	-
800	831	-
801	832	-
802	833	-
803	834	-
804	835	-
805	836	-
806	837	-
807	838	-
808	839	-
809	840	-
810	841	-
811	842	-
812	843	-
813	844	-
814	845	-
815	846	-
816	847	-
817	848	-
818	849	-
819	850	-
820	851	-
821	852	-
822	853	-
823	854	-
824	855	-
825	856	-
826	857	-
827	858	-
828	859	-
829	860	-
830	861	-
831	862	-
832	863	-
833	864	-
834	865	-
835	866	-
836	867	-
837	868	-
838	869	-
839	870	-
840	871	-
841	872	-
842	873	-
843	874	-
844	875	-
845	876	-
846	877	-
847	878	-
848	879	-
849	880	-
850	881	-
851	882	-
852	883	-
853	884	-
854	885	-
855	886	-
856	887	-
857	888	-
858	889	-
859	890	-
860	891	-
861	892	-
862	893	-
863	894	-
864	895	-
865	896	-
866	897	-
867	898	-
868	899	-
869	900	-
870	901	-
871	902	-
872	903	-
873	904	-
874	905	-
875	906	-
876	907	-
877	908	-
878	909	-
879	910	-
880	911	-
881	912	-
882	913	-
883	914	-
884	915	-
885	916	-
886	917	-
887	918	-
888	919	-
889	920	-
890	921	-
891	922	-
892	923	-
893	924	-
894	925	-
895	926	-
896	927	-
897	928	-
898	929	-
899	930	-
900	931	-
901	932</td	

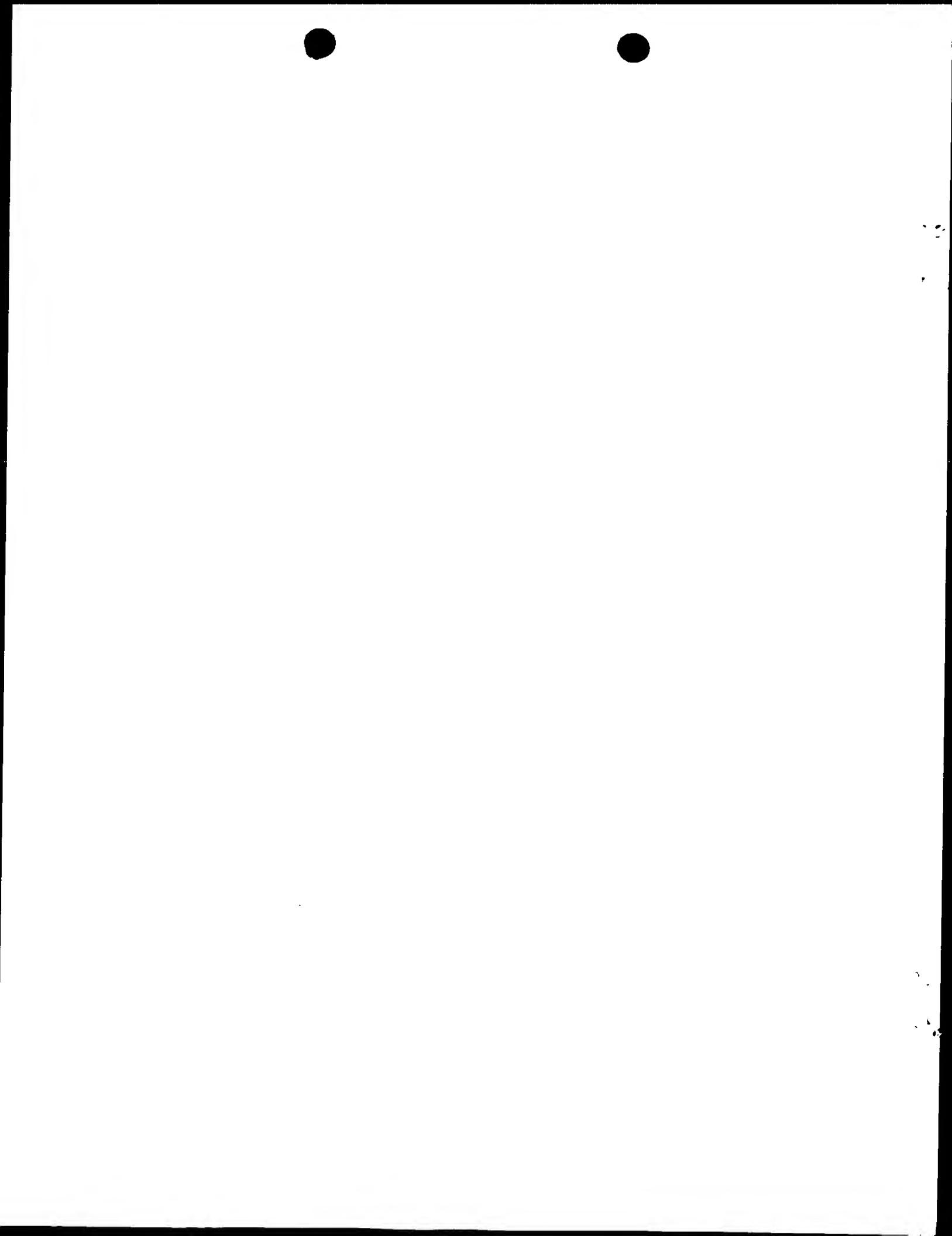
Fig. 2 (Forts.)



10/11

phdtk-3	433	.
pcdtk-3	1383	T
pmotk-2	882	.
phdtk-2	769	.
pmotk-1	1227	.
phdtk-1	829	.
pmotk-1	1298	.

Fig. 2 (Forts.)



11/11

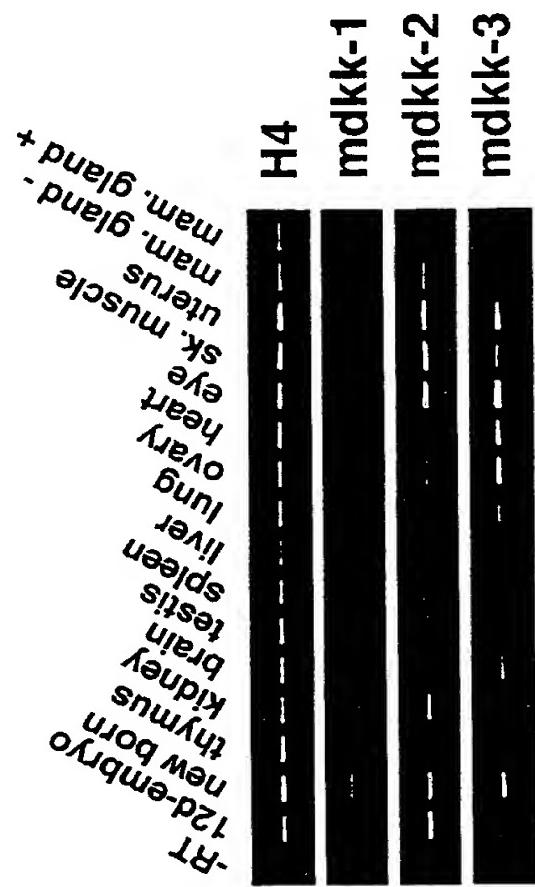
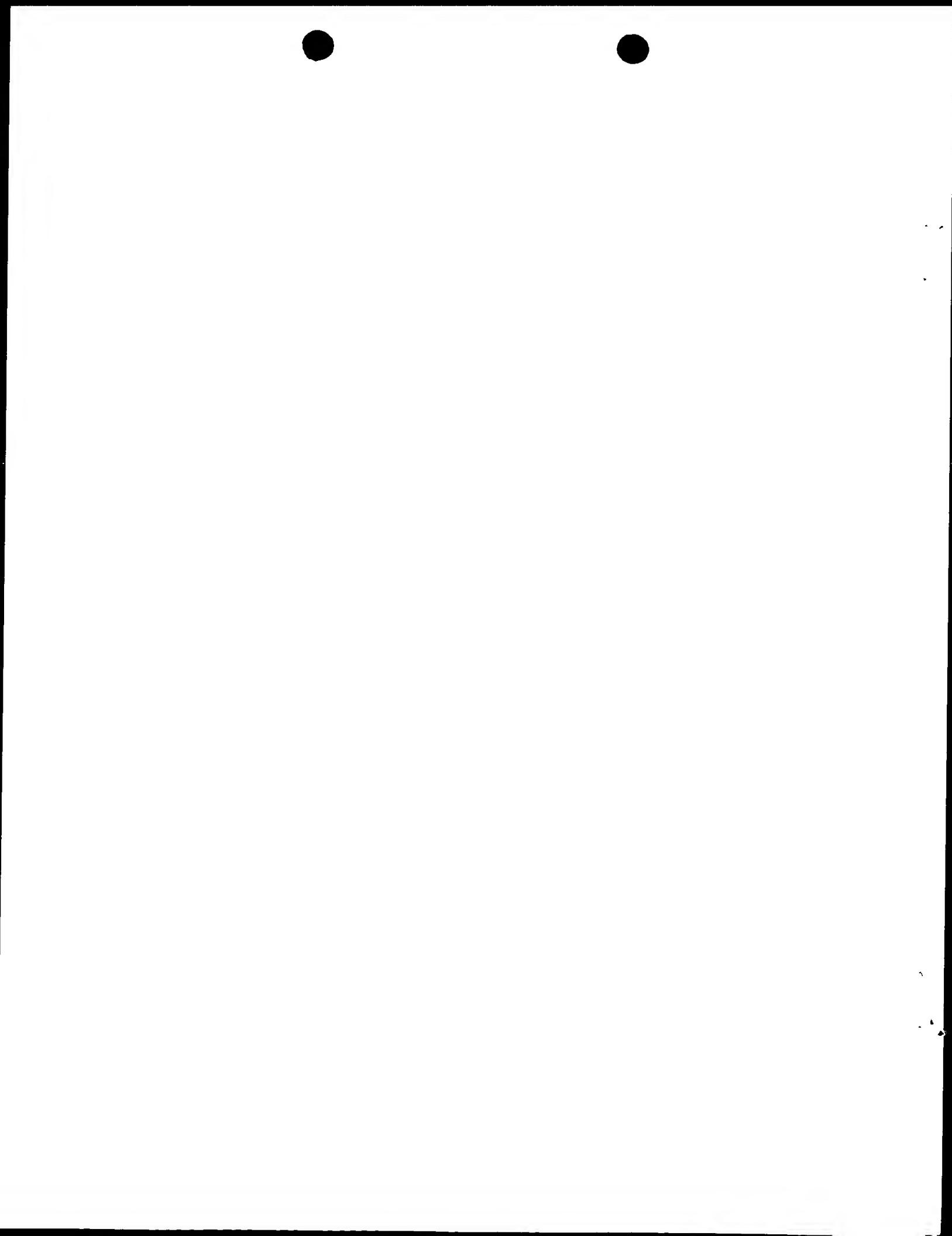


Fig. 3



## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Deutsches Krebsforschungszentrum
- (B) STRASSE: Im Neuenheimer Feld 280
- (C) ORT: Heidelberg
- (D) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 69120

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Inhibitorprotein des wnt-Signalwegs

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 7

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (v) DATEN DER VORANMELDUNG:

ANMELDENUMMER: DE 19747416.7

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1297 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

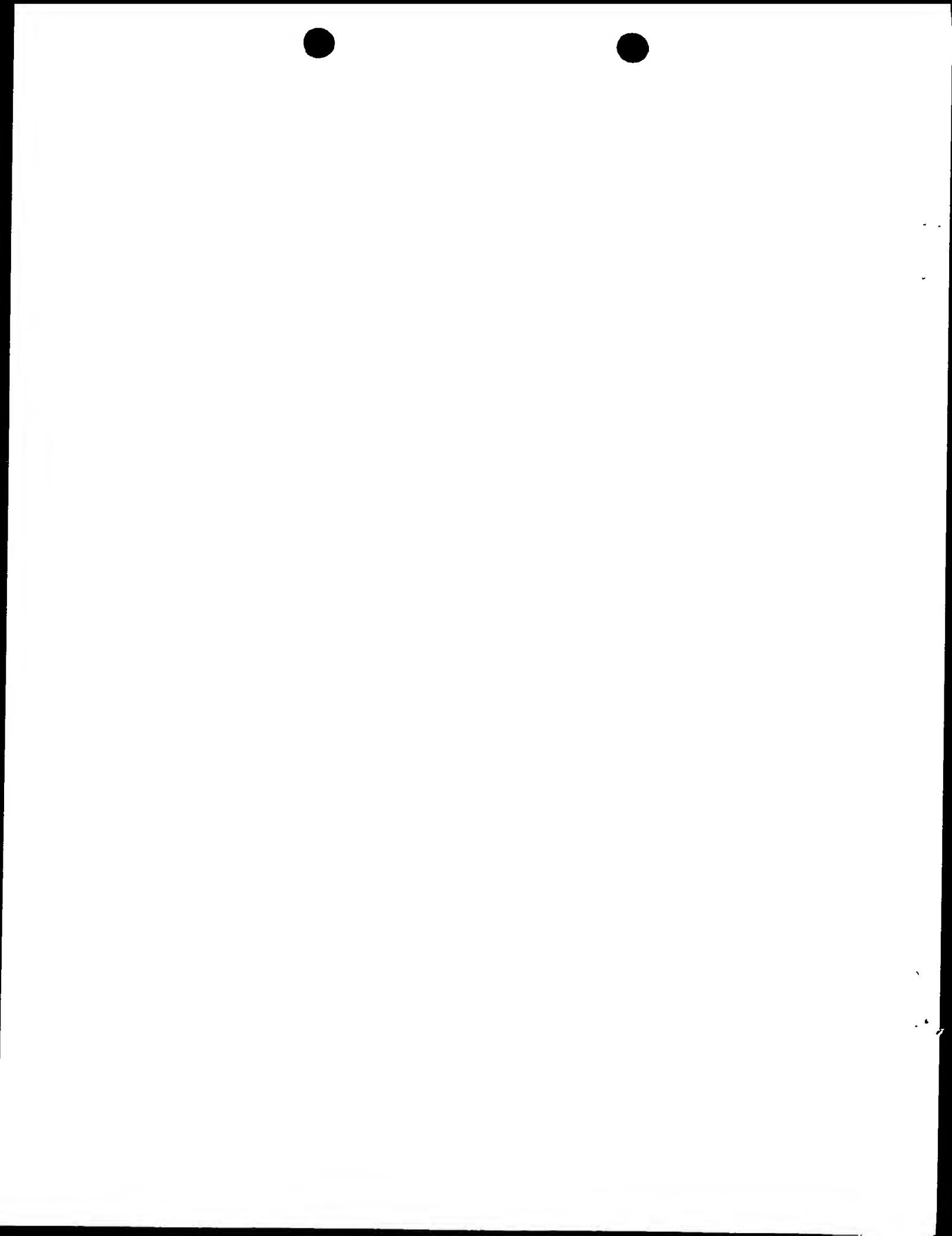
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GACAGTCGGA GCGGGCGCTG CAGCATCAAA GGGACTTATC TTGGAGGACT TGTGAATTCT	60
CATCCTGCCA TTGTGGTTAC TGAGTCTGGT TGGACAGAGG AATGGGCAGC AACATGTTCC	120
CGGTGCCTCT TATTGTCTTT TGGGGTTTTA TCTTGGATGG GGCACTTGGC TTTGTCACTGA	180
TGACCAACTC CAACTCCATC AAGAATGTGC CGGCGGCACC AGCAGGTCAG CCCATTGGCT	240
ACTACCCCTGT GAGCGTCAGT CCGGACTCCC TATATGATAT TGCCAACAAG TACCAACCTC	300
TGGATGCCTA CCCGCTCTAC AGTTGCACGG AAGATGATGA CTGTGCCCTT GATGAATTCT	360
GTCACAGTTC CAGAAACGGC AACTCTCTGG TTTGCTTGGC ATGCCGGAAA CGCAGAAAGC	420
GTTGCCTGAG GGACGCCATG TGCTGCACAG GCAACTACTG TAGCAACGGA ATTTGTGTCC	480
CTGTGGAGCA AGATCAAGAG CGCTTCCAAC ACCAGGGATA CCTGGAAGAA ACCATTCTGG	540
AAAACCTATAA TAATGCTGAT CATGCAACAA TGGATACTCA TTCCAAATTA ACCACGTCCC	600



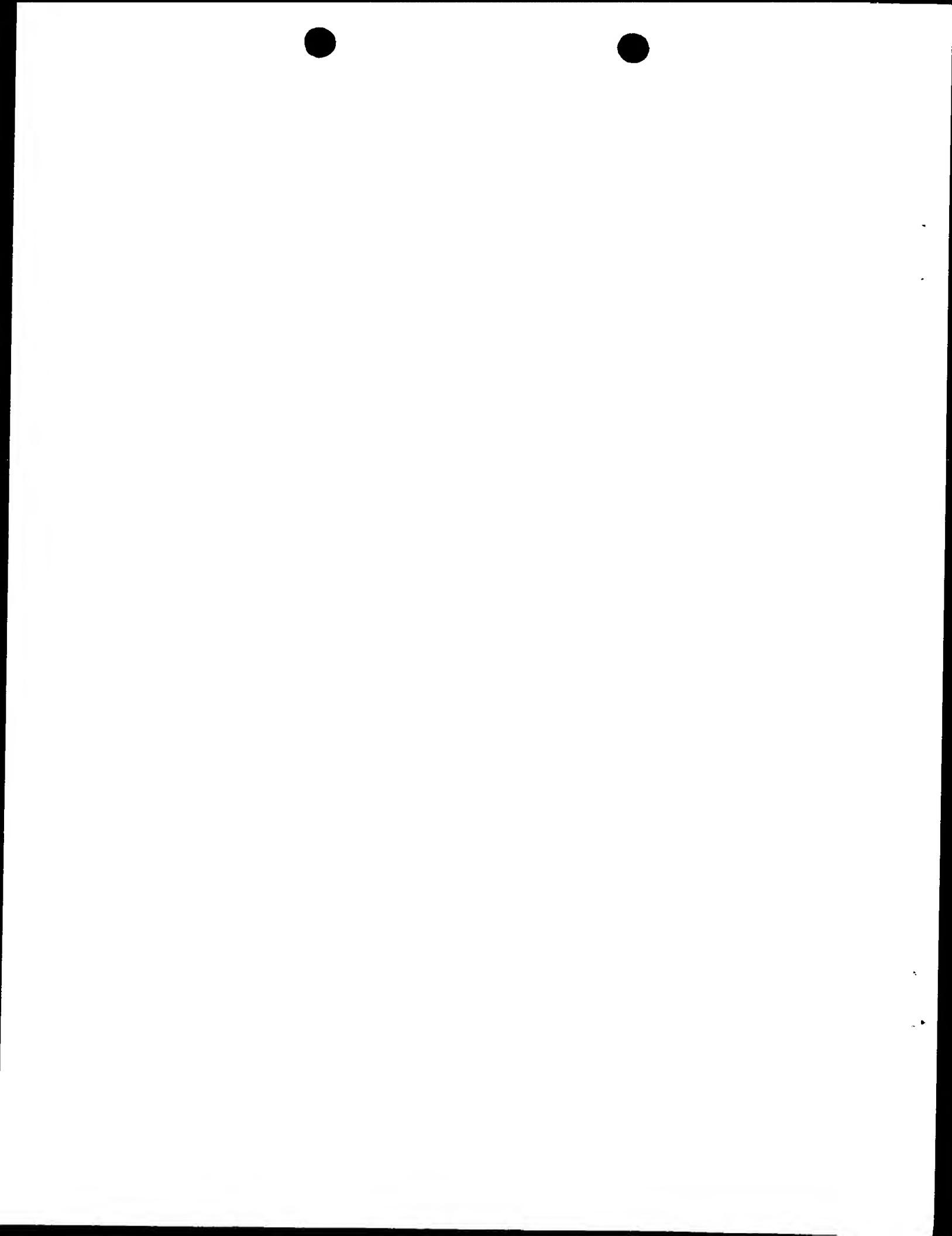
CATCTGGAAT GCAGCCCTTT AAAGGCCGTG ATGGTGATGT TTGCCTCCGA TCAACTGACT	660
GTGCGCCAGG TCTATGCTGT GCCCGTCATT TCTGGTCAAA GATCTGCAAG CCGGTCCTTG	720
ATGAAGGCCA AGTGTGCACC AAGCACAGGA GGAAAGGCTC TCACGGGCTA GAGATTTCC	780
AGCGTTGTCA CTGCGGTGCC GGACTCTCGT GCCGGTTACA GAAAGGAGAA TTTACAACTG	840
TCCCTAAAC ATCGAGACTT CACACTTGCC AAAGACACTA AGCGAGGCCT ACAGAGCCTG	900
AAGGACCTTC TCTAAATTAA GCTAATTAAG ACTTTGGTAC CTGCATGTTA TTTTCTCAGT	960
TTACATGAAG TGCTCTGGTC TTCCCTGAAC CCGGAAGCTG CGCAACTTGT TTCTTTTTTT	1020
GAGGAACCTTC CTAATTAAATG CTAATTACAG TAAATTACTG TGTTGTAAAT ACTACGCAAG	1080
GAGACCTGTA AAAACTGTAA ATACCCGTGT ATAGAAAGTG TACATGATCT TCTCTATTGT	1140
AACCTGCCAC CTTGTACATT CCGACGGCCT CTTCCCTTT TATATATATA TATATATAAA	1200
TATATATTAT ATTATGTAGA GTTTACGTCT AGTATGTCTG TATTTTTAAT TGAAATAAAA	1260
CATTTCTAAA CTTAAAAACA AAAAAAAA AAAAAAA	1297

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 881 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

TGCAGGCATG AACAGGACT GGGTTCGGCG GCAGTGAGAA GGGCAAAGC CTGGGGCAGG	60
CCTACCCTTG CAGCAGTGAT AAGGAATGTG AAGTTGGAAG ATACTGCCAC AGTCCCCACC	120
AAGGTTCATC AGCCTGCATG CTCTGTAGGA GGAAAAAGAA ACGATGCCAC AGAGATGGGA	180
TGTGTTGCCCG TGTTACCCGC TGCAATAATG GAATCTGCAT CCCAGTCACT GAGAGCATCC	240
TCACCCCACA TATCCCAGCT CTGGATGGCA CCCGGCATAG AGATCGAAC CATGGTCACT	300
ATTCCAACCA TGACCTGGGA TGGCAGAAC TAGGAAGGCC ACACCTCAAG ATGCCTCATA	360
TAAAAGGACA TGAAGGAGAC CCATGCCTAC GGTGATCAGA CTGCATTGAT GGGTTTTGTT	420
GTGCTCGCCA CTTCTGGACC AAAATCTGCA AACCAAGTGT CCATCAGGGG GAAAGTCTGTA	480
CCAAACAAACG CAAGAAGGGT TCGCACGGGC TGGAGATTTT CCAGAGGTGT GACTGTGCAA	540
AGGGCCTGTC CTGCAAAGTG TGGAAAGATG CCACCTACTC TTCCAAAGCC AGACTCCATG	600
TATGCCAGAA GATCTGATAA ACACGTGAAG AGTCATCACT AGCAGACTGT GAATTGTGT	660



ATTTAATGCA TTATGGCATG ATGGAAACCT GGATTGGAAT GCGGAAGAAT GAGGGATGTG	720
GTAAGAATGT GGAGCAGAAG AGGGCAGGAC TGAATCAAGT AGAGTCGACA ACAACCAAAG	780
TACTACCAGT GCTTCCGT TA TGTGCCTCAT CTATGTAAAT AATGTACACA TTTGTAAAAA	840
TGCTATTATT AAAAGAAAGC ACACCATGGA AATTACAAAA A	881

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 1226 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

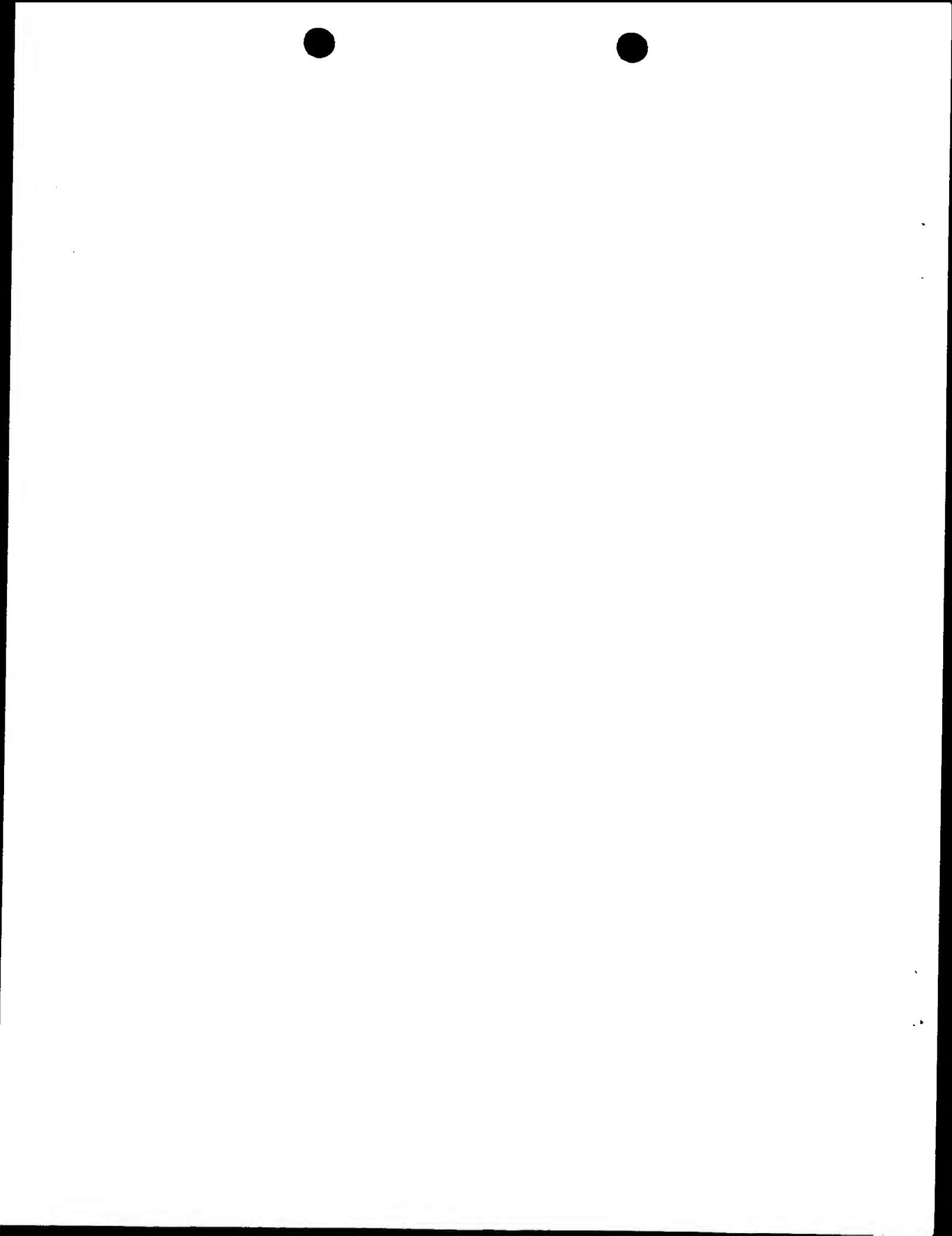
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GACCCACGCG TCGTGCCTG TTTGCGTCCT TCGGAGATGA TGGTTGTGTG TGCACCGGCA	60
GCTGTCCGGT TCTTGGCCGT GTTTACAATG ATGGCTCTCT GCAGCCTCCC TCTGCTAGGA	120
GCCAGTGCCA CCTTGAACTC AGTTCTCATC AATTCCAACG CGATCAAGAA CCTGCCCCCA	180
CCGCTGGGTG GTGCTGGGGG GCAGCCGGC TCTGCTGTCA GTGTGGGCC GGGAGTTCTC	240
TATGAGGGCG GGAACAAGTA CCAGACTCTT GACAACCTACC AGCCCTACCC TTGCGCTGAA	300
GATGAGGAGT GCGGCTCTGA CGAGTACTGC TCCAGCCCCA GCCGCGGGC AGCCGGCGTC	360
GGAGGTGTAC AGATCTGTCT GGCTTGCAGA AAGCGCAGGA AGCGCTGCAT GACGCACGCT	420
ATGTGCTGCC CGGGAACTA CTGCAAAAT GGAATATGCA TGCCCTCTGA CCACAGCCAT	480
TTTCCTCGAG GGGAAATTGA GGAAAGCATC ATTGAAAACC TTGGTAATGA CCACAACGCC	540
GCCGGGGGG ATGGATATCC CAGAAGAACC ACACTGACTT CAAAAATAA TCACACCAAA	600
GGACAAGAAG GCTCCGTCTG CCTCCGATCA TCAGACTGTG CCGCAGGGCT GTGTTGTGCA	660
AGACACTTCT GGTCCAAGAT CTGTAAACCT GTCCTTAAAG AAGTCAGGT GTGCACCAAG	720
CACAAACGGA AAGGCTCCCA CGGGCTGGAG ATATTCCAGC GCTGTTACTG CGGGGAAGGC	780
CTGGCTTGCA GGATACAGAA AGATCACCAT CAAGCCAGCA ATTCTTCTAG GCTCCACACC	840
TGCCAGAGAC ACTAAACCGA CAGTCTAAAT ATGATGGACT CTTTTATCT AATATATGCT	900
ACGAAAATCC TTTATGATTT GTCAGCTCAA TCCCAAGGAT GTAGGAATCT TCAGTGTGTA	960
ATTAAGCATT CCCACAATAC TTTCCAAAAG CTCTGGAGTG TAAGGACTTT GTTTCTTGAT	1020
GGAACTCCCC TGTGATTGCA GTAAATTACT GTGTTGTAAA TCCTCAGTGT GGCACATTACC	1080
TGTAAATGCA GCAAAACTTT TAATTATTT TCTAGAGGTG TGGTACATTG CCTTGTTCT	1140



CTTGCATGTA AATTTTTTT GTACACGGTT GATTGTCTTG ACTCATAAAT ATTCTATATT 1200  
 GGAGTAGAAA AAAAAAAA AAAAAA 1226

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 768 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

ATACGACTCA CTATAGGGAA TTTGCCCTC GAGGCCAAGA ATTGGCACG AGGGTTGGGA	60
GGTATTGCCA CAGTCCCCAC CAAGGATCAT CGGCCTGCAT GGTGTGTCGG AGAAAAAAGA	120
AGCGCTGCCA CCGAGATGGC ATGTGCTGCC CCAGTACCCG CTGCAATAAT GGCATCTGTA	180
TCCCAGTTAC TGAAAGCATC TTAACCCCTC ACATCCGGC TCTGGATGGT ACTCGGCACA	240
GAGATCGAAA CCACGGTCAT TACTCAAACC ATGACTTGGG ATGGCAGAAT CTAGGAAGAC	300
CACACACTAA GATGTCACAT ATAAAAGGGC ATGAAGGAGA CCCCTGCCTA CGATCATCAG	360
ACTGCATTGA AGGGTTTGC TGTGCTCGTC ATTTCTGGAC CAAAATCTGC AAACCAGTGC	420
TCCATCAGGG GGAAGTCTGT ACCAAACAAAC GCAAGAAGGG TTCTCATGGG CTGGAAATT	480
TCCAGCGTTG CGACTGTGCG AAGGGCCTGT CTTGCAAAGT ATGGAAAGAT GCCACCTACT	540
CCTCCAAAGC CAGACTCCAT GTGTGTCAGA AAATTTGATC ACCATTGAGG AACATCATCA	600
ATTGCAGACT GTGAAGTTGT GTATTTAATG CATTATAGCA TGGTGGAAAA TAAGGTTTCAG	660
ATGCAGAAGA ATGGCTAAAA TAAGAACGT GATAAGAATA TAGATGATCA CAAAAAAA	720
AAAAAAAAAG ATGCGGCCGC AAGCTTATTC CCTTTAGTGA GGGTTAAT	768

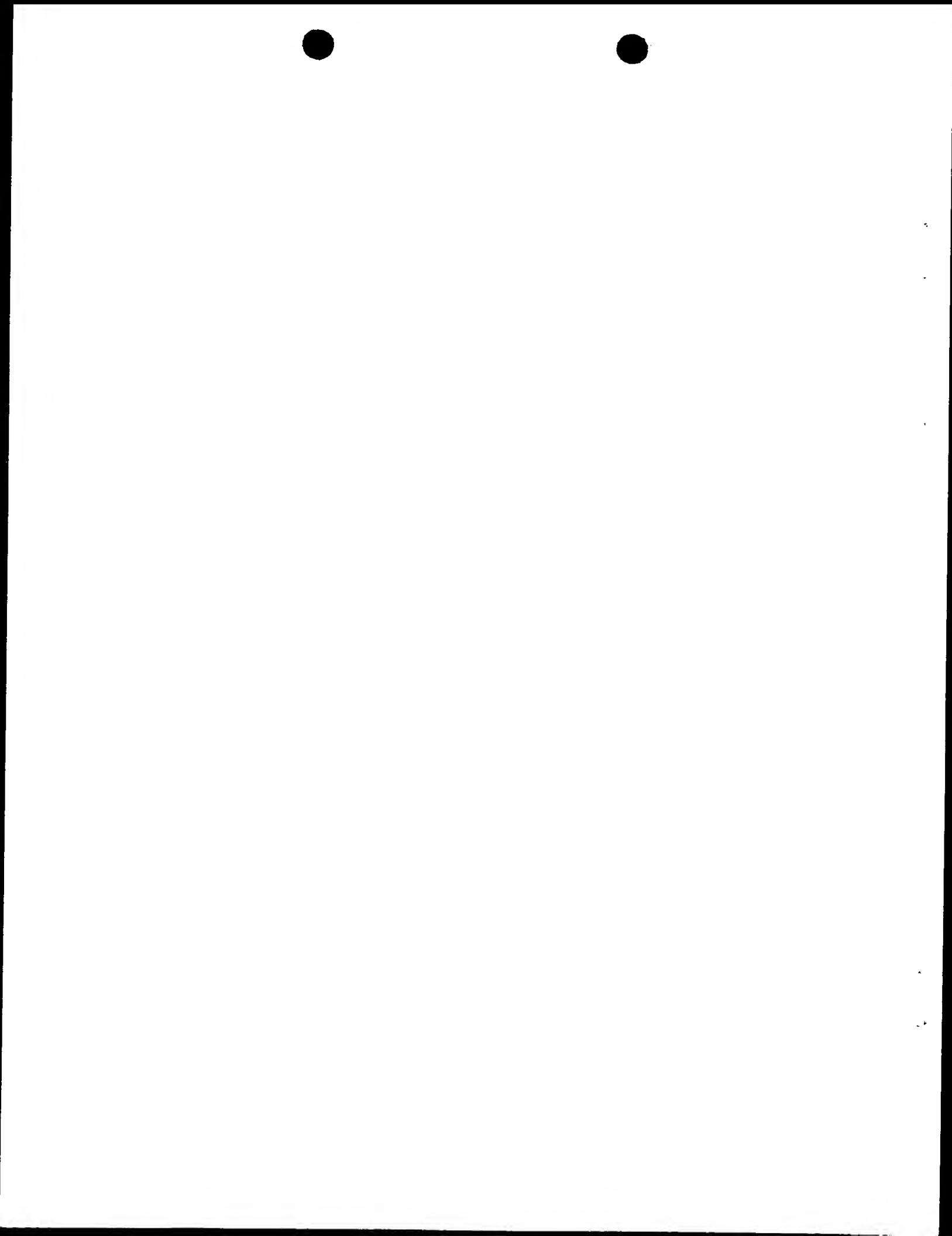
## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 828 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN



## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

TGGCCCCGCA CGCCAAAAAT TCGGCACGAG GGTCTGGCAC TCAGAGGATG CTCTGACCTT	60
GAAAGGGTCC TATCTGGAGA CGAGGGAGTA CAACGTGCTG AATGTGTGCG GTTCAGGGAG	120
CATTTGGTAA CCCTGCATTT GGGAGCAGTG GGCACTAACC GGTTTGGAG AGGTGGACAC	180
ATAAGGACTG TGATCAGCGC CCGGGTCCAA GAGGGCGGGT ACCTGGACCT CTGGGTGCCT	240
CACCCCTCTCC CCGAACCCCTT CCCACAGCCG TACCCGTGCG CAGAGGACGA GGAGTGCAGC	300
ACTGATGAGT ACTGCGCTAG TCCCACCCCG CGGAGGGGAC CGCCGGCCGT GCAAATCTGT	360
CTCGCCTGCA GGAAGCGCCG AAAACGCTGC ATGCGTCAGG CTATGTGCTG CCCCGGAAAT	420
TACTGCAAAA ATGGAATATG TGTGTCTTCT GATCAAAATC ATTTCCGAGG AGAAATTGAG	480
GAAACCATCA CTGAAAGCTT TGGTAATGAT CATAGCACCT TGGATGGGTA TTCCAGAAGA	540
ACCACCTTGT CTTCAAAAAT GTATCACACC AAAGGACAAG AAGGTTCTGT TTGTCTCCGG	600
TCATCACACT GTGCCCTCAGG ATTGTGTTGT GCTAGACACT TCTGGTCCAA GATCTGTAAA	660
CCTGTCTGAA AGAAGGTCA AGTGTGTACC AAGCATAGGA GAAAAGGCTC TCATGGACTA	720
GAAATATTCC AGCGTTGTTA CTGTGGAGAA GGTCTGTCTT GCCGGATAACA GAAAGATCAC	780
CATCAAGCCA GTAATTCTTC TAGGCTTCAC ACTTGTCAAGA GACACTAA	828

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 432 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleotid  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: linear

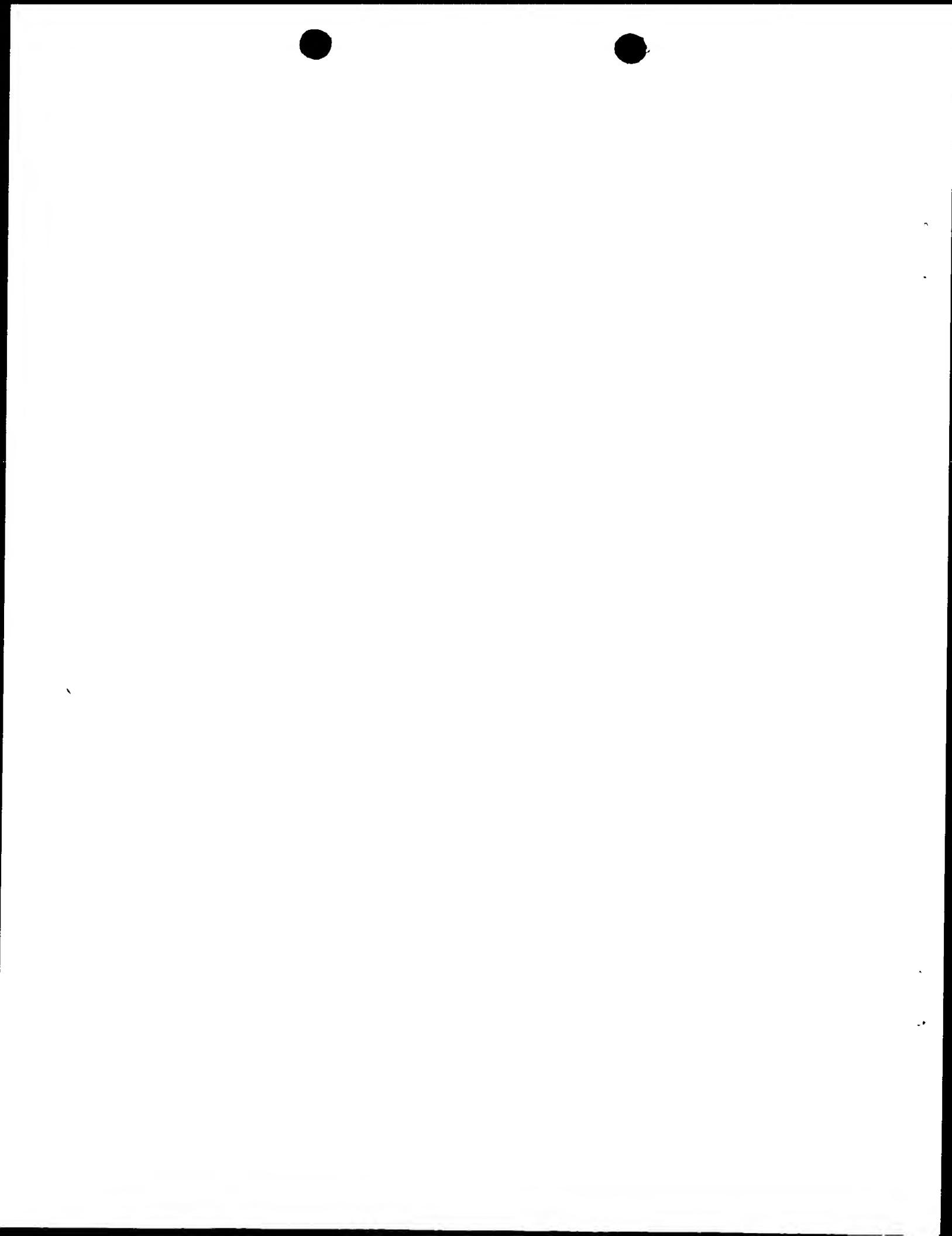
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

GCGGTGGCGG CCGCTCTAGA ATAGTGGATC CCCCCGGCTG CAGGAATTG GCACGAGCGG	60
CTGCGGGCGC AGAGCGGAGA TGCAGCGGCT TGGGCCACCC TGCTGTGCCT GCTGCTGGCG	120
GGCGCGGTCC CCACGGCCCC CGCGCCCGCT CCGACGGCGA CCTCGGCTCC AGTCAAGCCC	180
GGCCCGGCTC TCAGCTACCC GCAGGAGGAG GCCACCCCTCA ATGAGATGTT CCGCGGGTGA	240
GGAAACTGATG GAGGACACGC AGCACAAATT GCGCAGCGCG GTGGAAGAGA TGGAGGCAGA	300
AGAAGCTGCT GCTAAAGCAA TCATCAGAAG TGAACCTGGC AAACTTACCT CCCAGCTATC	360
ACAATGAGAC CAACACAGAC ACGAAGGTTG GAAATAATAA CCATCCATGT GCACCGAGAA	420
ATTCAACAGT TT	432

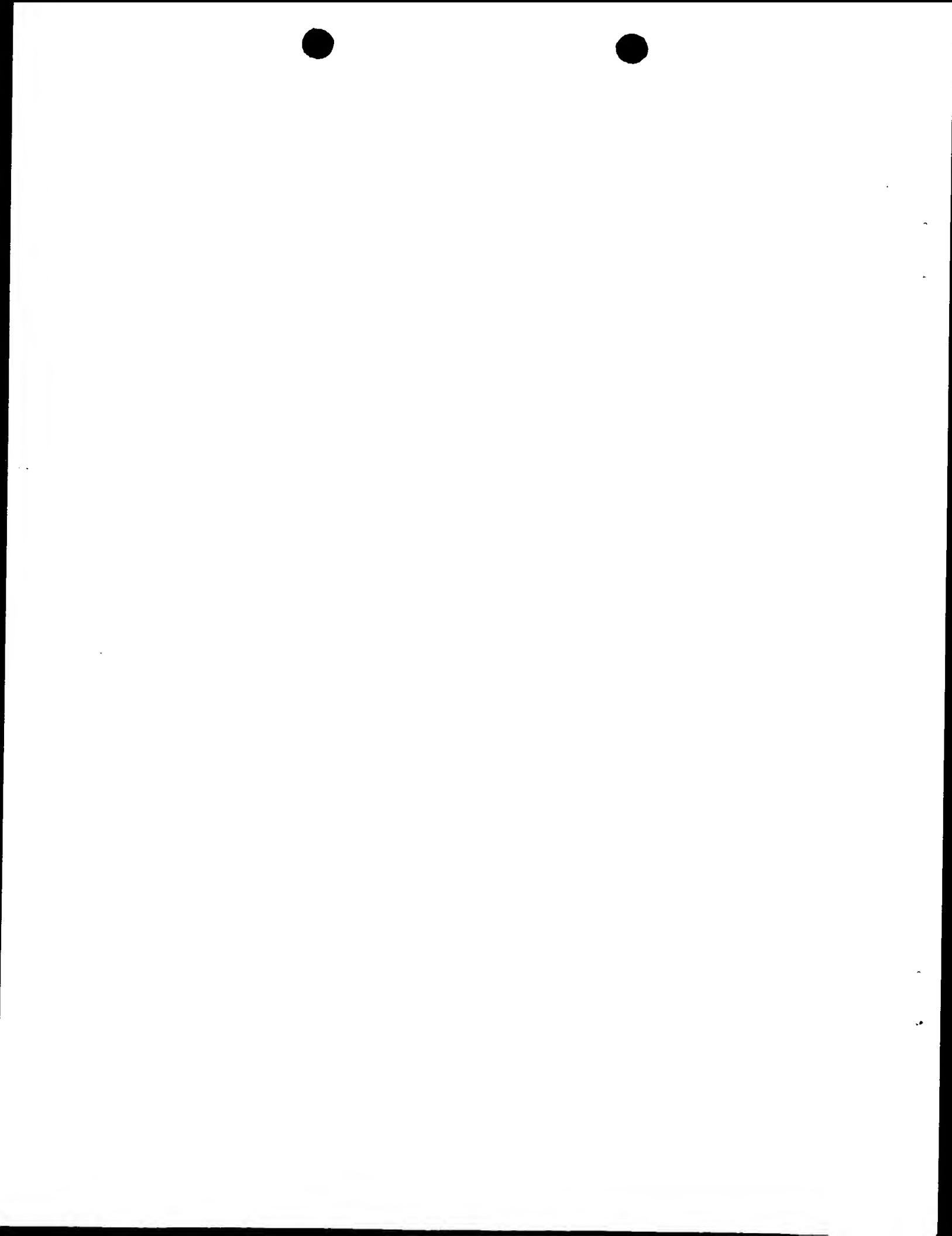


## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 1383 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

CGCGGAGCGG CAGCGGCCGC TGAGGGAGC	60
CGCGGCCGCG ATGGCTGCTG CTGTTGCCG	120
GGAGCGGCCG GCGGCCAGCC TGGGCGAGAT	180
TGATGGAGGA CACGCAGCAC AAGCTGCGCA	240
AAAGGGCAAA AAAACTGTCA GAAGTAAACT	300
AGTCCAACAC AGAAAACCAGA ATTGGTAATA	360
AGGTTACAGA TAACAGAACT GGATCAACAA	420
AGGGTGGAGA AAACAAAAGA AATCATGAGT	480
AGTATTGCCA GTTCTCCACC TTTGAATACA	540
ACTGCTCACG AGATGTTGAA TGCTGCGGAG	600
AAGCCACTTC AAGAGGAGAA AATGGTACCA	660
GAACGTGCTG TGCTTTCAAG AAAGAACTGC	720
AAGGTGAACC TTGCCATGAT CCTTCAAACAA	780
AACCTGATGG AGTACTAGAG CGCTGCCAT	840
GGACCCACAG TACTACATCT GTGTGTGAAC	900
AAGAAGATCC CTTGAACATG GATGAGATGC	960
TTTCTGATTA CGAAGAAAGC AGCGTCATTC	1020
AGGACCAAGC AGGTGTGAAG TCTGAGCATG	1080
CCGTTTCGT GCACCAAACC TGCATGTTCA	1140
AAATATGAAG TTCAAACACC AGTTTAGTTA	1200
TACATACACC CTTAACAGAT ACTGCTGGAT	1260
CCAAACTTTC CATCAAAGAC AAATGAGAAA	1320
TCCTTTGTAC ACCAGAAATA AACGTATCAG	1380



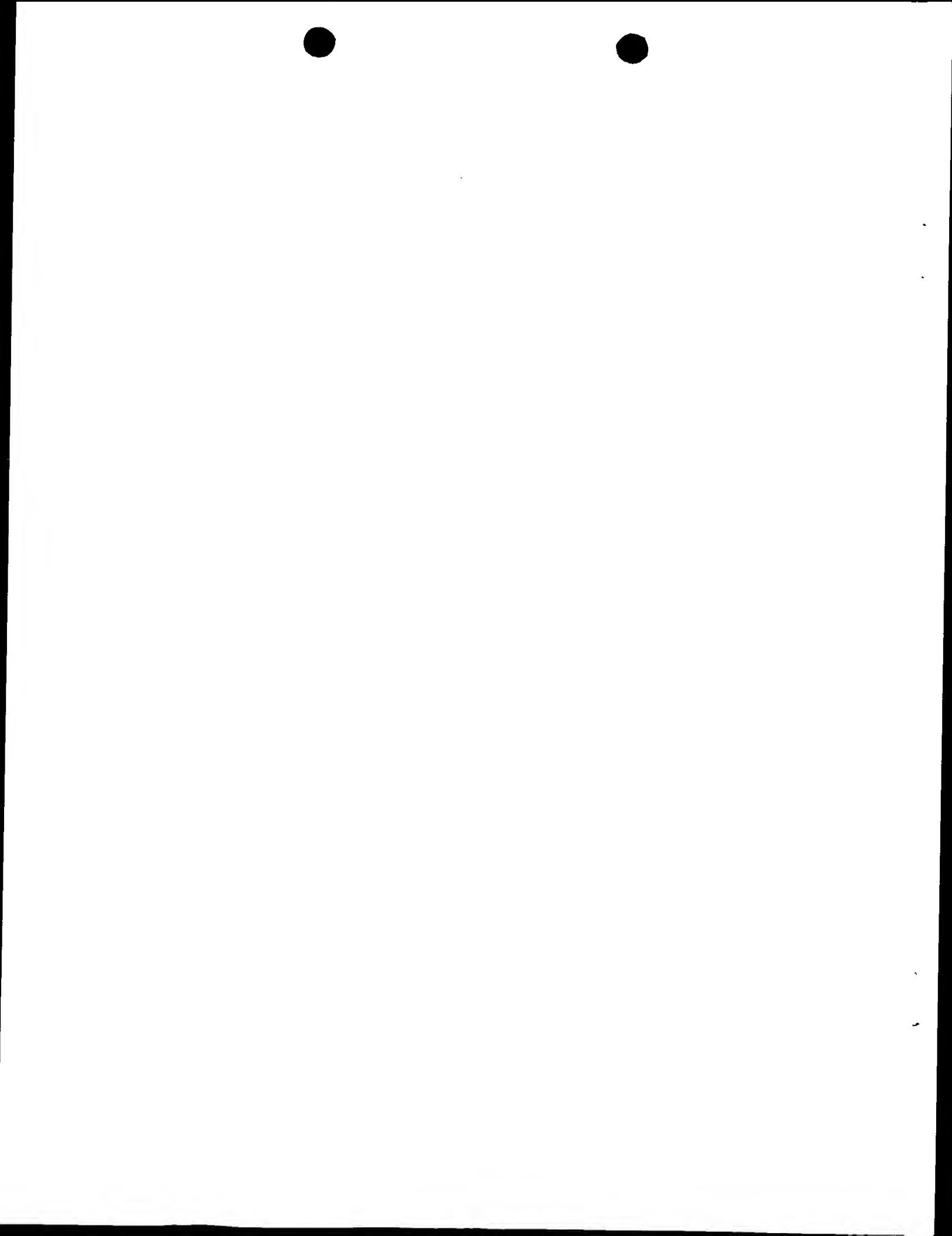
WO 99/22000

PCT/DE98/03155

7

CAT

1383



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE 98/03155

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>					
IPC 6	C12N15/18	C07K14/475	C07K16/22	C12N5/10	A61K38/22
	A61K48/00	G01N33/53	C12Q1/68		

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SAWADA K ET AL: "Characterization of terminally differentiated cell state by categorizing cDNA clones derived from chicken lens fibers." INT J DEV BIOL, JUN 1996, 40 (3) P531-5, XP002096086 SPAIN see the whole document -& EMVRT DATABASE Accession number D26311 29-JUL-1994 (Rel. 40, Created) Sawada K XP002096089 see the whole document ----	3,4
X	-/-	3,4

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

10 March 1999

23/03/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gurdjian, D

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE 98/03155

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GLINKA A ET AL: "Head induction by simultaneous repression of Bmp and Wnt signalling in Xenopus." NATURE, OCT 2 1997, 389 (6650) P517-9, XP002096087 ENGLAND see the whole document ---	1-10
P,X	GLINKA, ANDREI ET AL: "Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction" NATURE (LONDON) (1998), 391(6665), 357-362 CODEN: NATUAS; ISSN: 0028-0836, XP002096088 see the whole document -----	1-10

## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

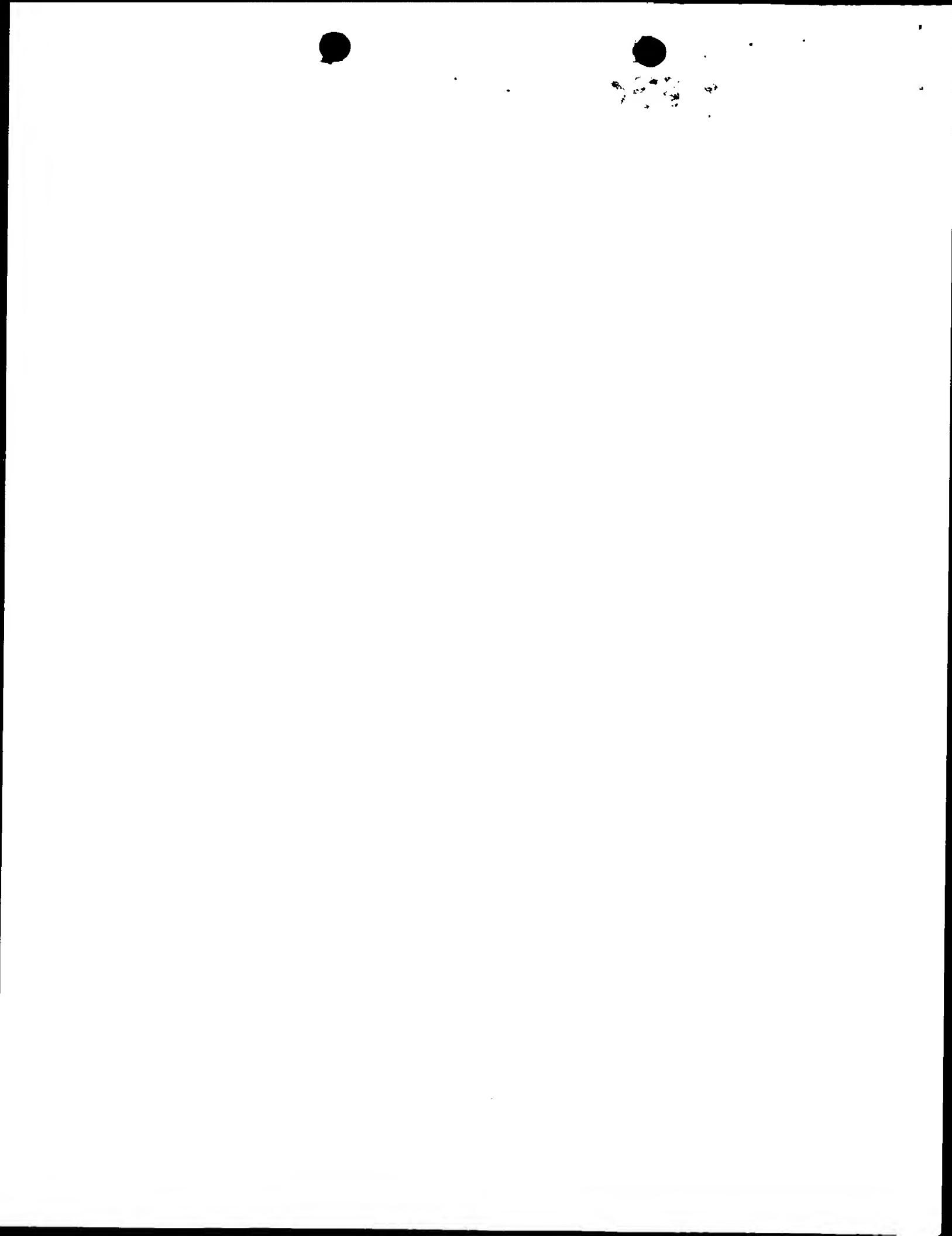
## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference K 2607 - hu/km	<b>FOR FURTHER ACTION</b>	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/DE98/03155	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) 27 October 1998 (27.10.98)	Priority date ( <i>day/month/year</i> ) 27 October 1997 (27.10.97)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/18		
Applicant DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>1</u> sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</li> <li>II <input type="checkbox"/> Priority</li> <li>III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</li> <li>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</li> <li>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</li> <li>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</li> <li>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</li> <li>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</li> </ul>

Date of submission of the demand 25 May 1999 (25.05.99)	Date of completion of this report 20 January 2000 (20.01.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/DE98/03155

**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

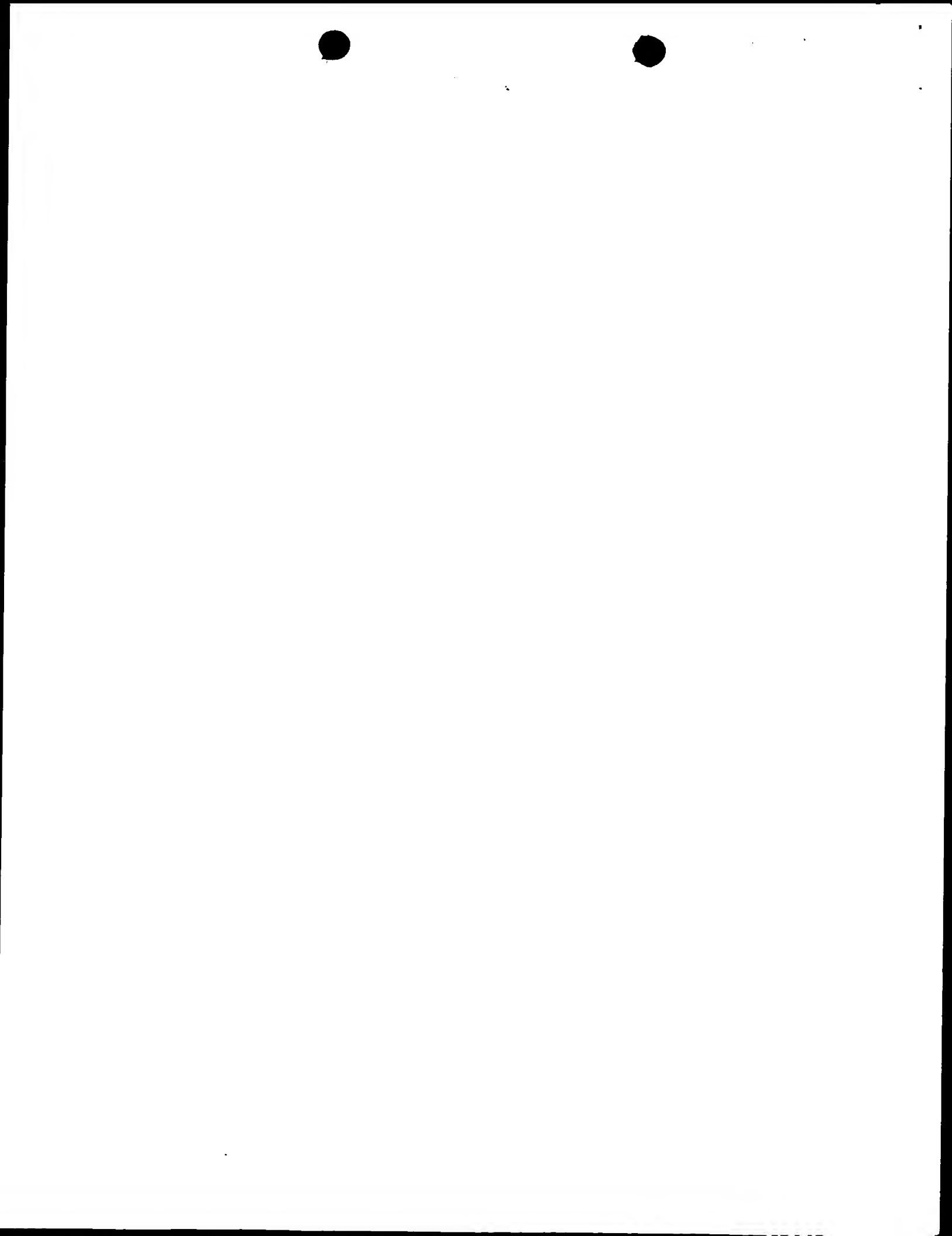
 the international application as originally filed. the description, pages 1-11, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_ the claims, Nos. \_\_\_\_\_, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. 1-7, filed with the letter of 23 December 1999 (23.12.1999),  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_ the drawings, sheets/fig 1/11-11/11, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

 the description, pages \_\_\_\_\_ the claims, Nos. \_\_\_\_\_ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3.  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

**PCT/DE98/03155****III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

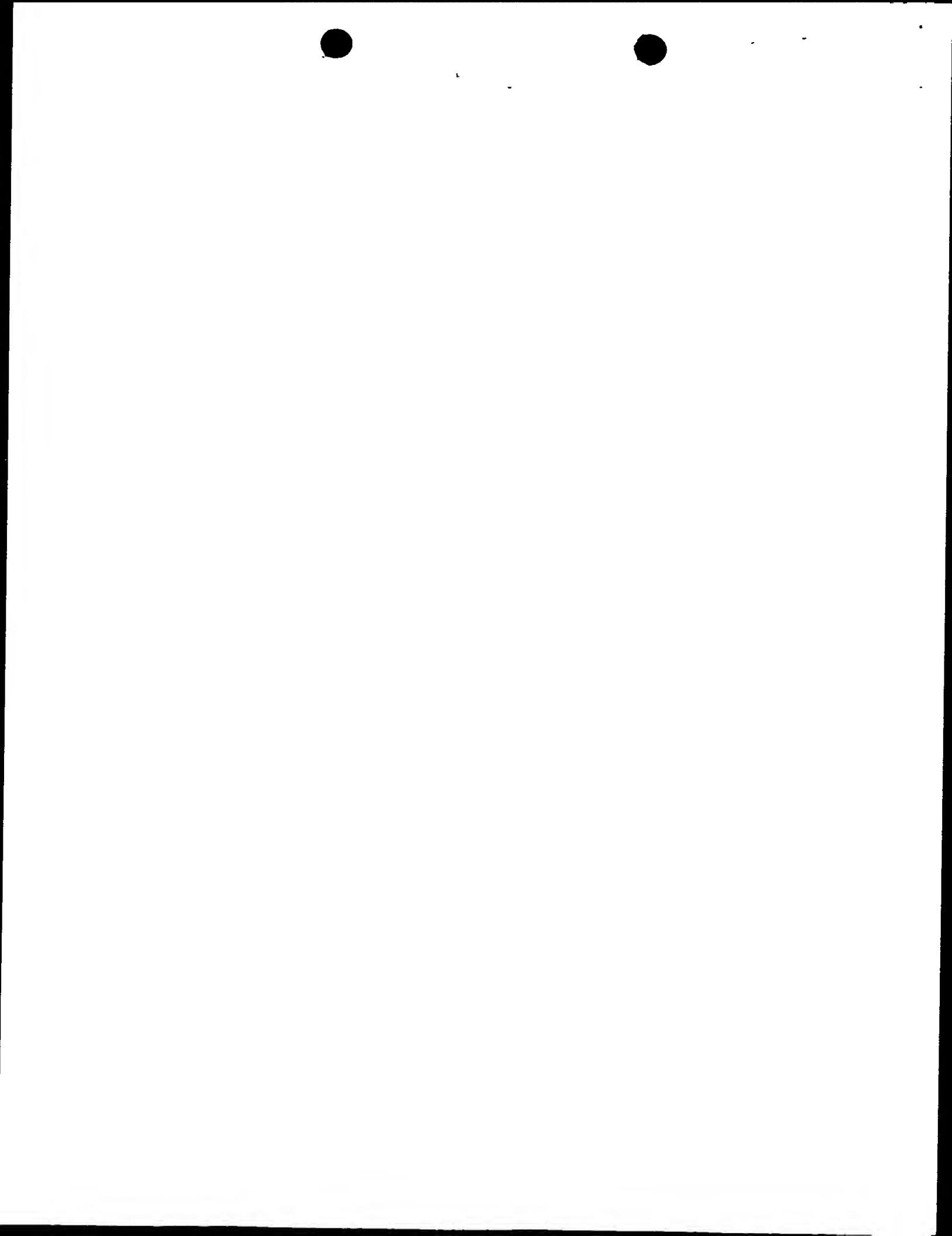
- the entire international application.
- claims Nos. 7

because:

- the said international application, or the said claims Nos. \_\_\_\_\_ relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

- the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- the claims, or said claims Nos. 7 are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- no international search report has been established for said claims Nos. \_\_\_\_\_



**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

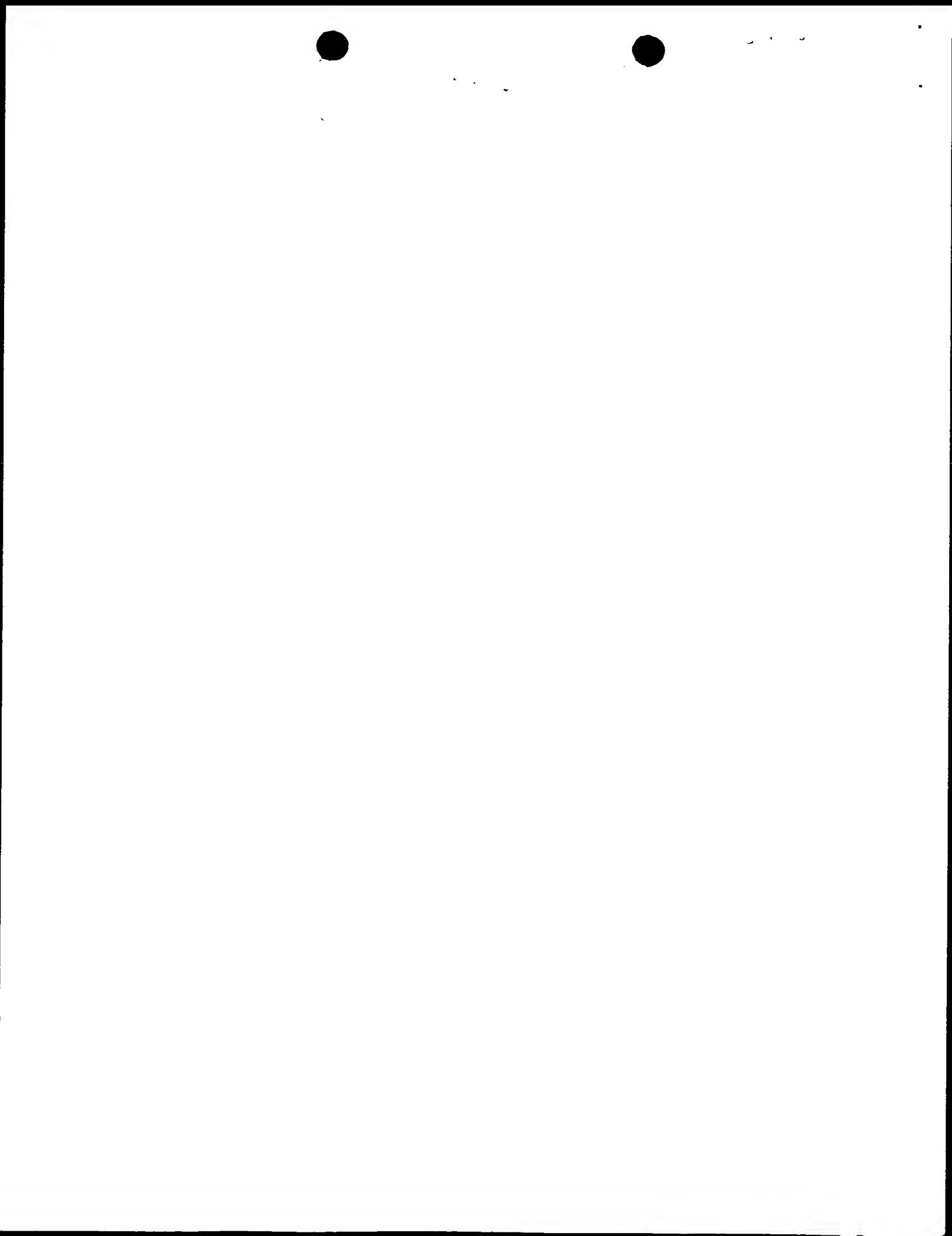
PCT/DE 98/03155

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-6	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-6	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-6	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

See Supplemental Sheet.



**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

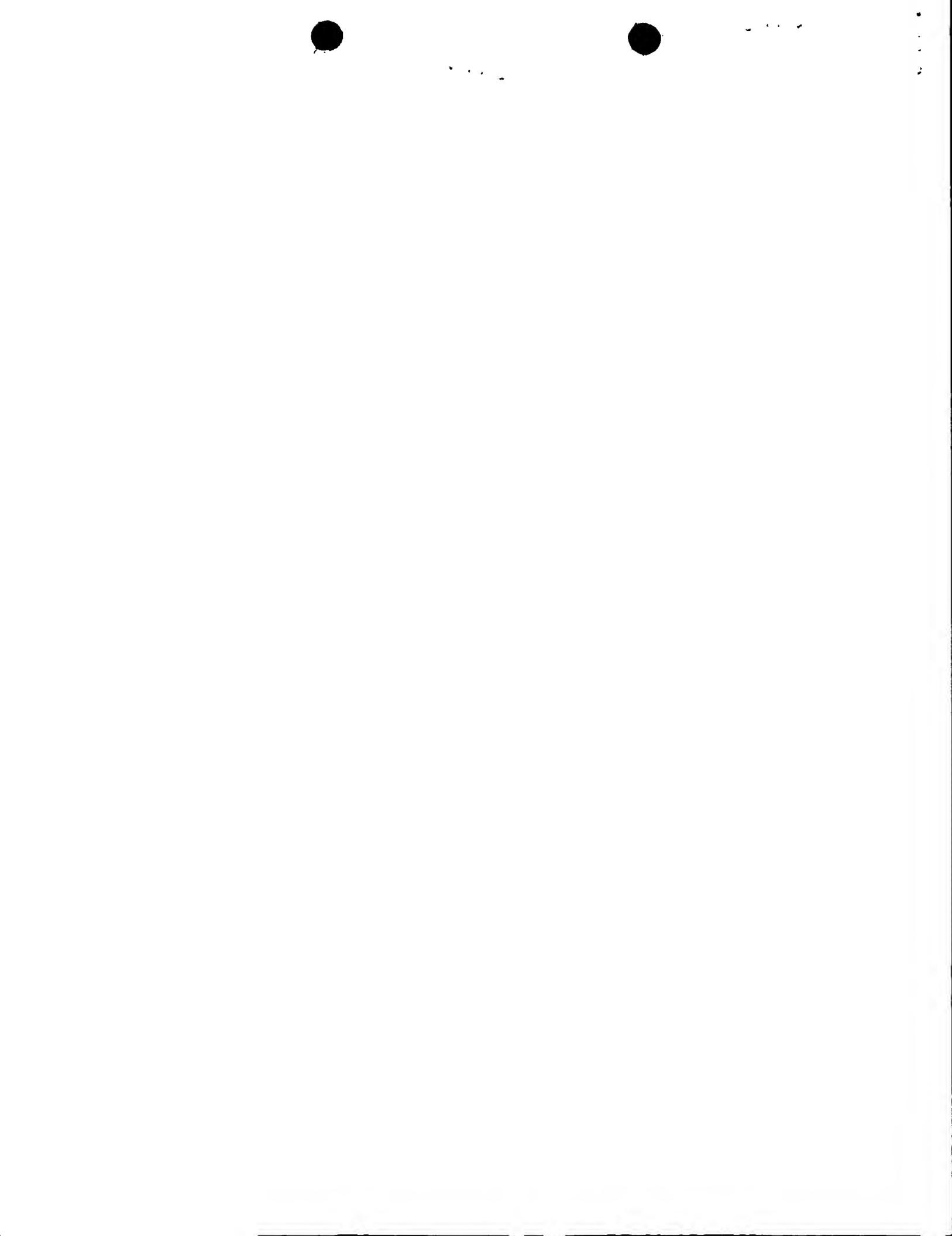
PCT/DE 98/03155

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III and V

1. The present application relates to six specific inhibitors of the wnt signalling pathway, a DNA, a DNA coding for these inhibitors, antibodies as well as the use of the inhibitors.  
Although inhibitors of the wnt signalling pathway have already been described in the prior art (D1: Int. J. Biol., Vol. 40: 531-535, 1996; D2: Nature, Vol. 389, 2.10.1997), the claimed inhibitors are different and cannot be clearly derived from this prior art in an obvious manner. Consequently, Claims 1 to 6 meet the requirements of PCT Article 33(2) and (3).
  
2. The following objections have been raised as regards Claim 7:  
The application does not indicate any experimental data to show that the isolated clones can in fact be used for diagnosis and therapy. Indeed, the expression of the clone has not been shown once (with the exception of clone 2.6 phdk-1).  
Therefore, a potential use per se for the specific clone is purely speculative. Consequently, there is also no support for the use of the broadened proteins, i.e. defined by the amino acid consensus sequences I and II. Consequently, Claim 7 does not meet the requirements of PCT Articles 5 and 6.

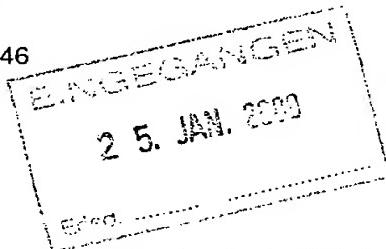


# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN  
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

SCHÜSSLER Andrea  
Huber & Schüssler  
Truderinger Strasse 246  
D-81825 München  
ALLEMAGNE



## PCT

### MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN PRÜFUNGSBERICHTS

(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum  
(Tag/Monat/Jahr)

20. 01. 00

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts  
K 2607 - hu/km

### WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/03155	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) 27/10/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 27/10/1997
--	--	--

Anmelder  
DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM ... et al

- Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
- Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
- Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

#### 4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

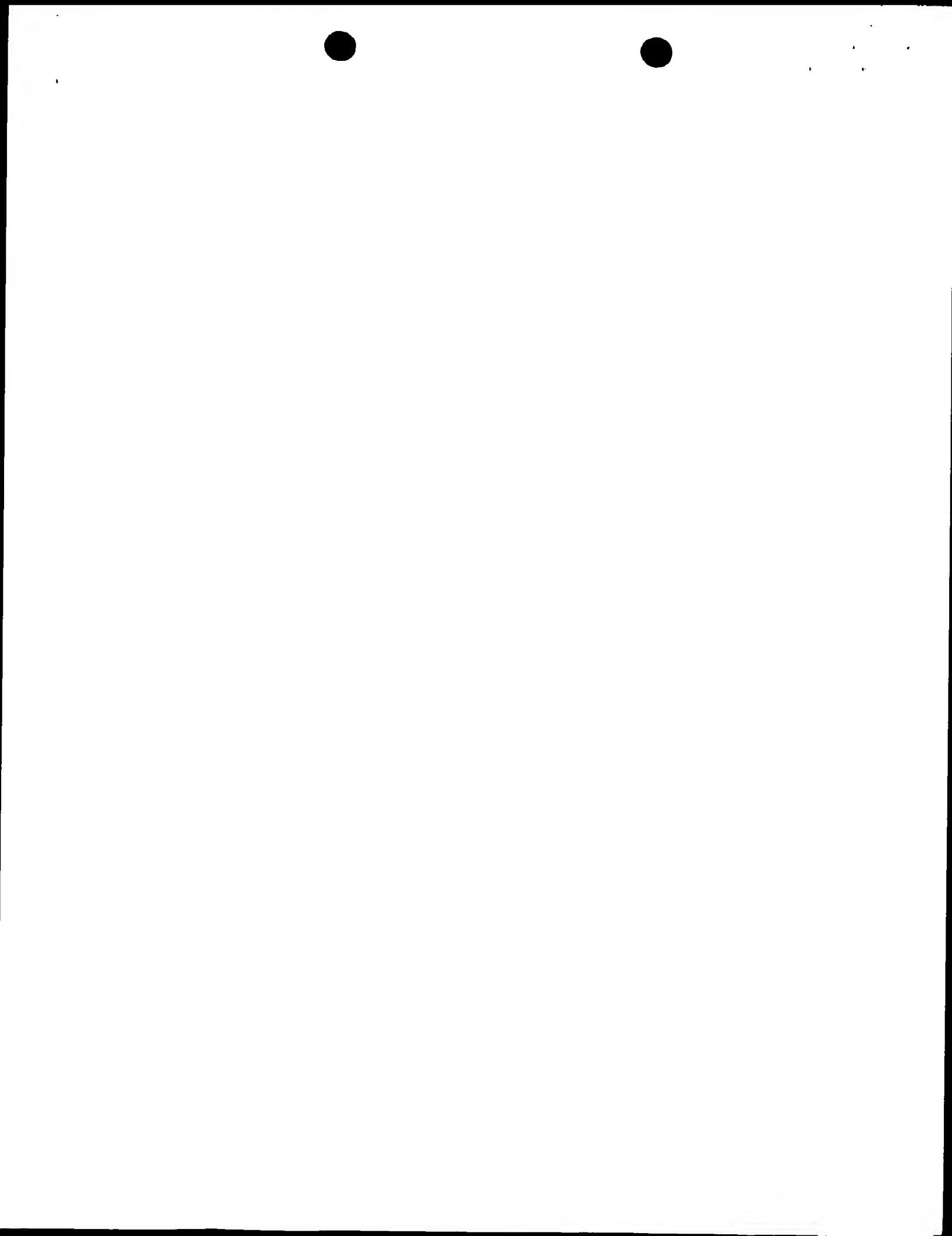
Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordemissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung  
beauftragten Behörde  
Europäisches Patentamt  
D-80298 München  
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d  
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter  
Vullo, C  
Tel. +49 89 2399-8061





**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM  
GEBIET DES PATENTWESENS**

**PCT**

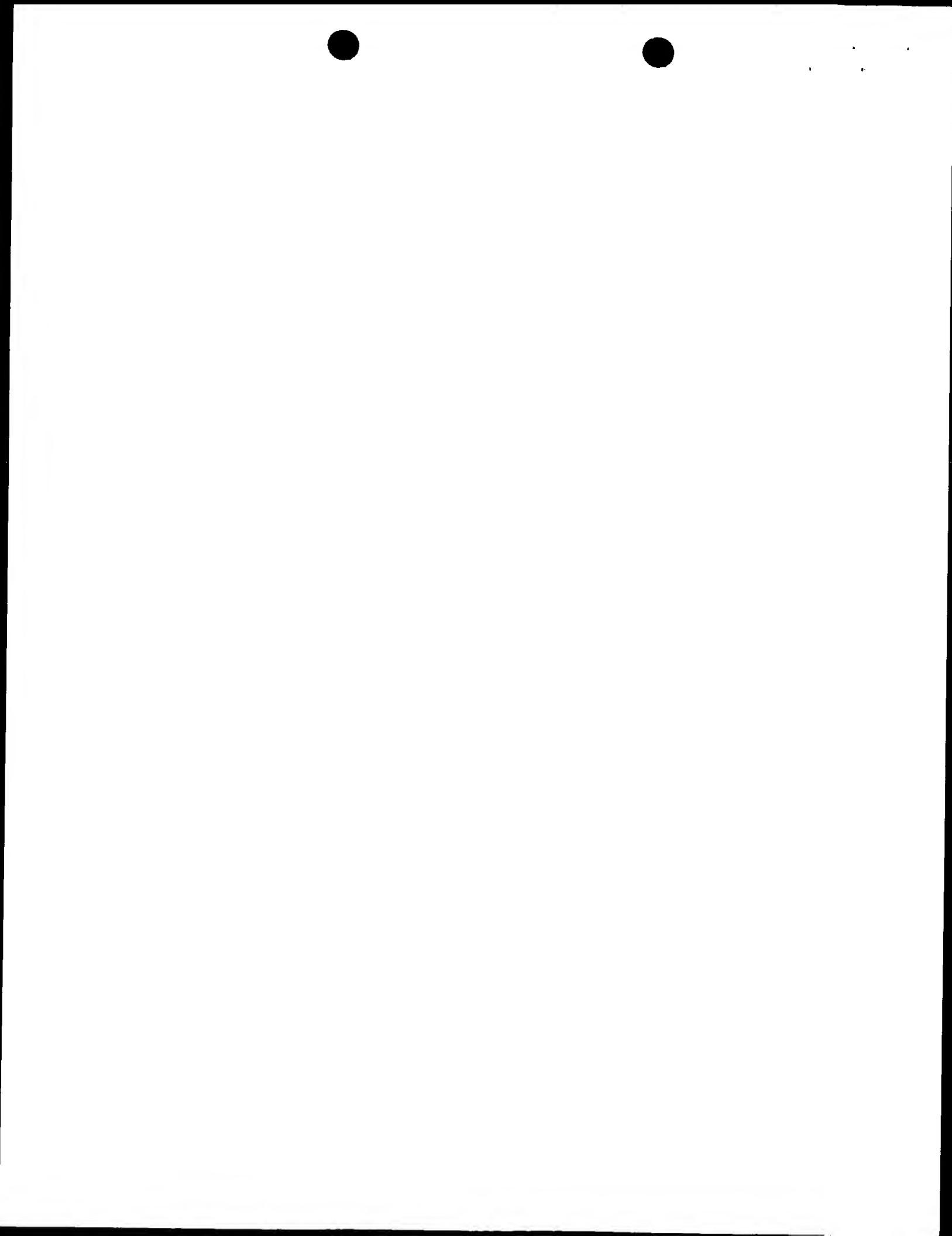
**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT**

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts  K 2607 - hu/km	<b>WEITERES VORGEHEN</b>	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen  PCT/DE98/03155	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr)  27/10/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag)  27/10/1997
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK  C12N15/18		
Anmelder  DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGZENTRUM ... et al		
<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt 1 Blätter.</p> <p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <p>I    <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts II   <input type="checkbox"/> Priorität III   <input checked="" type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit IV   <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung V    <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung VI   <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen VII   <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung VIII   <input type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung</p>		

Datum der Einreichung des Antrags  25/05/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  20.01.00
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Vollbach, S Tel. Nr. +49 89 2399 8715





**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER  
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/03155

**I. Grundlage des Berichts**

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.:*)

**Beschreibung, Seiten:**

1-11                    ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-7                    mit Telefax vom 23/12/1999

**Zeichnungen, Blätter:**

1/11-11/11            ursprüngliche Fassung

**2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:**

- Beschreibung,        Seiten:  
 Ansprüche,            Nr.:  
 Zeichnungen,           Blatt:

3.  Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

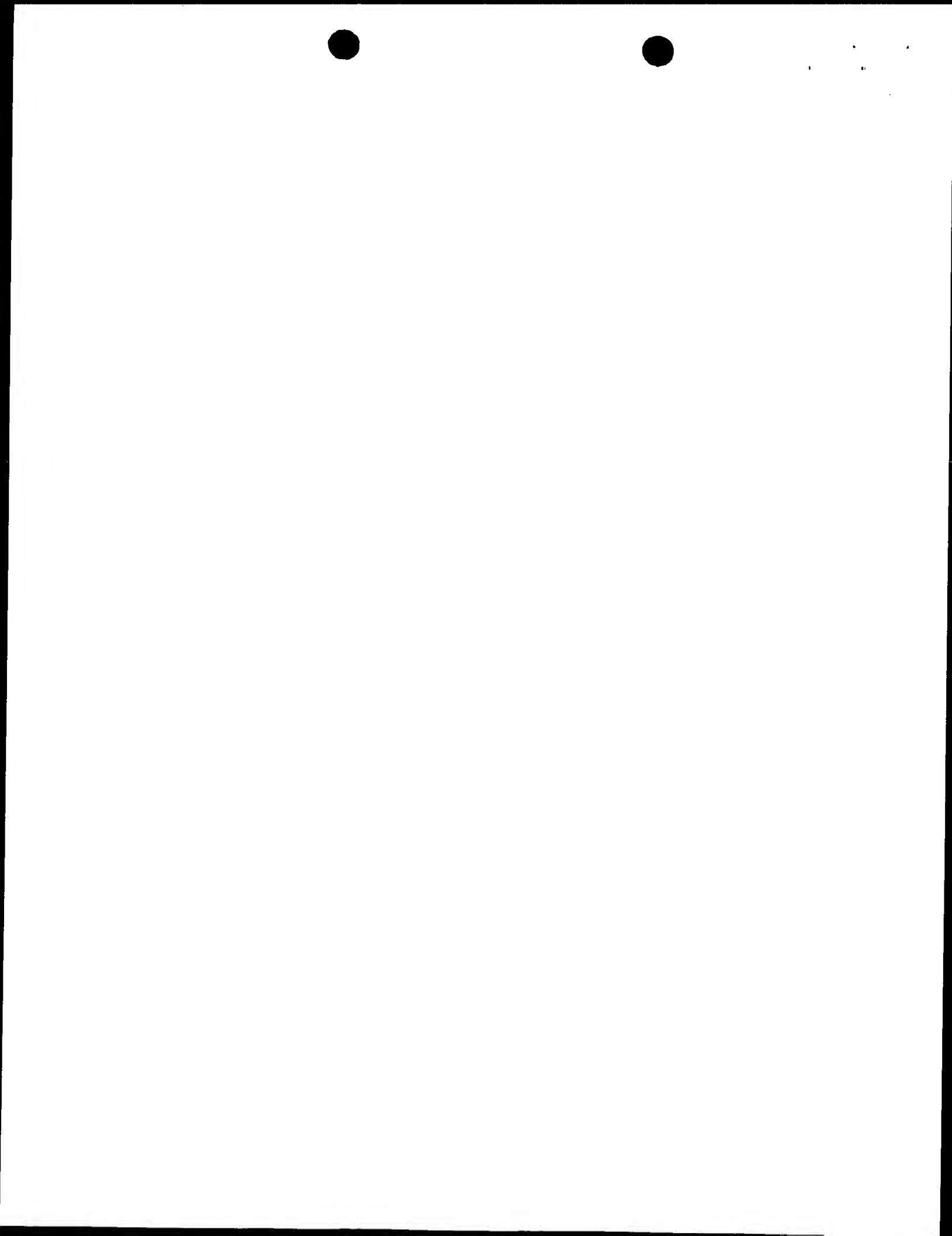
**4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:**

**III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit**

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erforderlicher Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- die gesamte internationale Anmeldung.  
 Ansprüche Nr. 7.

**Begründung:**



# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/03155

- Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
- Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 7 sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

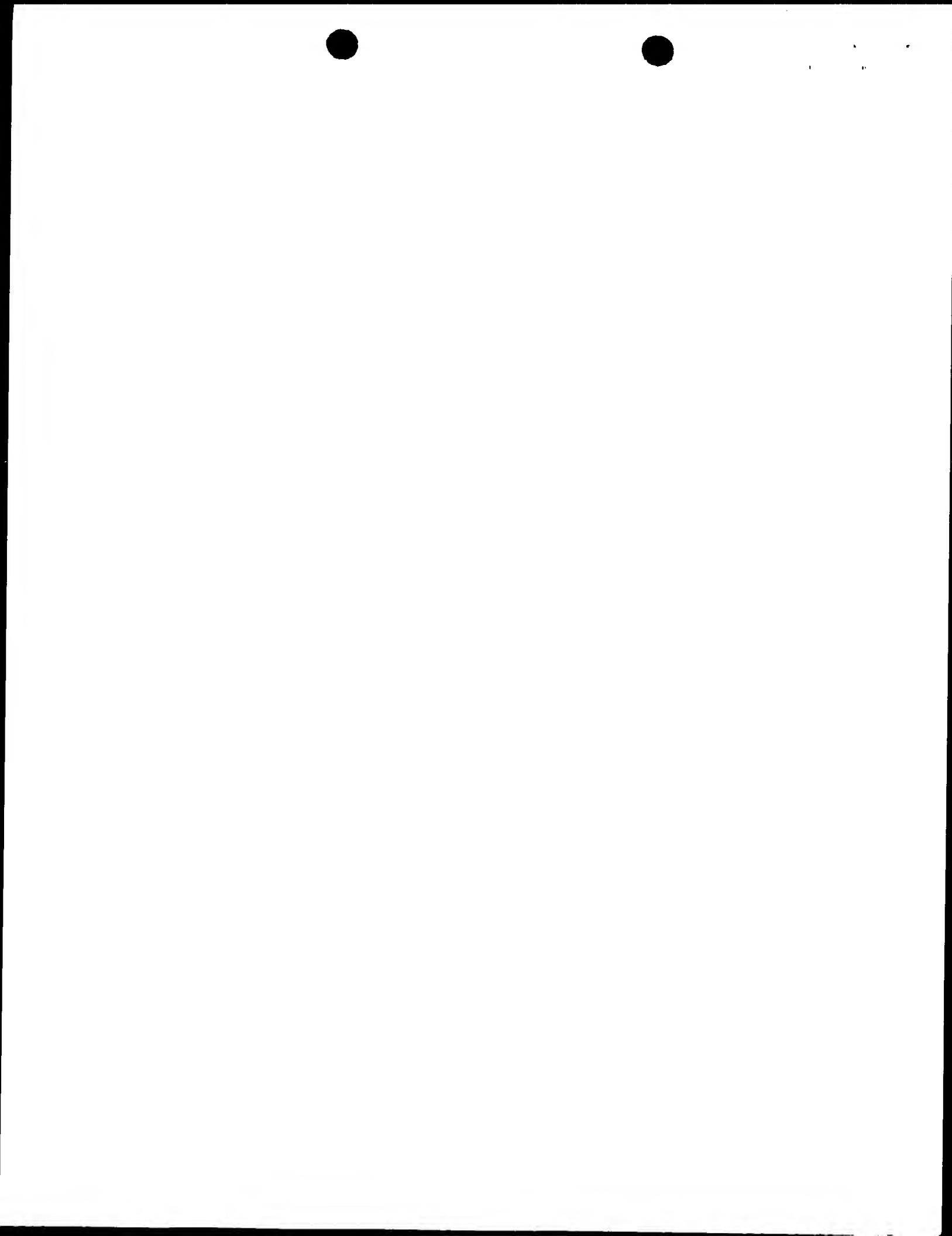
## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderlichen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

### 1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja:	Ansprüche 1-6
	Nein:	Ansprüche
Erforderliche Tätigkeit (ET)	Ja:	Ansprüche 1-6
	Nein:	Ansprüche
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja:	Ansprüche 1-6
	Nein:	Ansprüche

### 2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

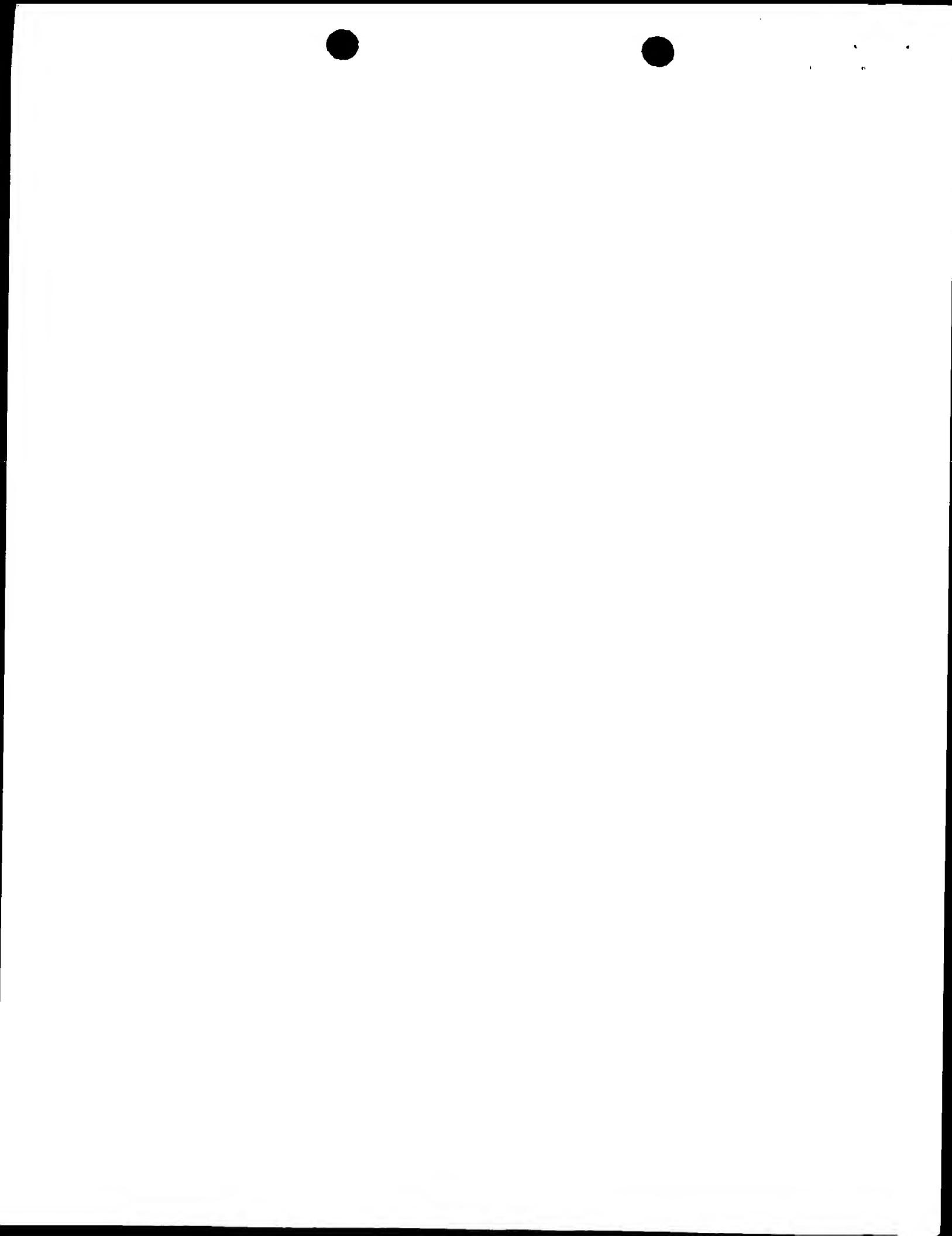


1. Die vorliegende Anmeldung betrifft sechs spezifische Inhibitoren des wnt-Signalweges, die DNA, die diese Inhibitoren kodierende DNA, Antikörper und die Verwendung der Inhibitoren.

Obwohl im Stand der Technik bereits Inhibitoren des wnt Signalweges bereits beschrieben sind (D1: Int. J. Biol., vol. 40:531-535, 1996, D2: Nature, vol. 389, 2.10.1997), sind die beanspruchten Inhibitoren unterschiedlich und nicht in naheliegender Weise herleitbar aus diesem Stand der Technik. Daher entsprechen die Ansprüche 1-6 den Erfordernissen der Artikel 33(2) und 33(3) PCT.

2. Anspruch 7 ist wie folgt zu beanstanden:

In der Anmeldung werden keine experimentellen Daten geliefert, daß die isolierten Klone tatsächlich Verwendung finden in der Diagnostik und Therapie. Tatsächlich ist noch nicht einmal die Expression der Klone (ausgenommen des Klones 2.6 phdk-1) gezeigt worden. Eine potentielle Verwendung selbst der spezifischen Klone ist somit völlig spekulativ. Folglich gibt es auch keine Stützung für die Verwendung der Proteine in der verbreiterten Form d.h. definiert über die Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II. . Daher entspricht der Anspruch 7 nicht den Erfordernissen der Artikel 5 und 6 PCT.

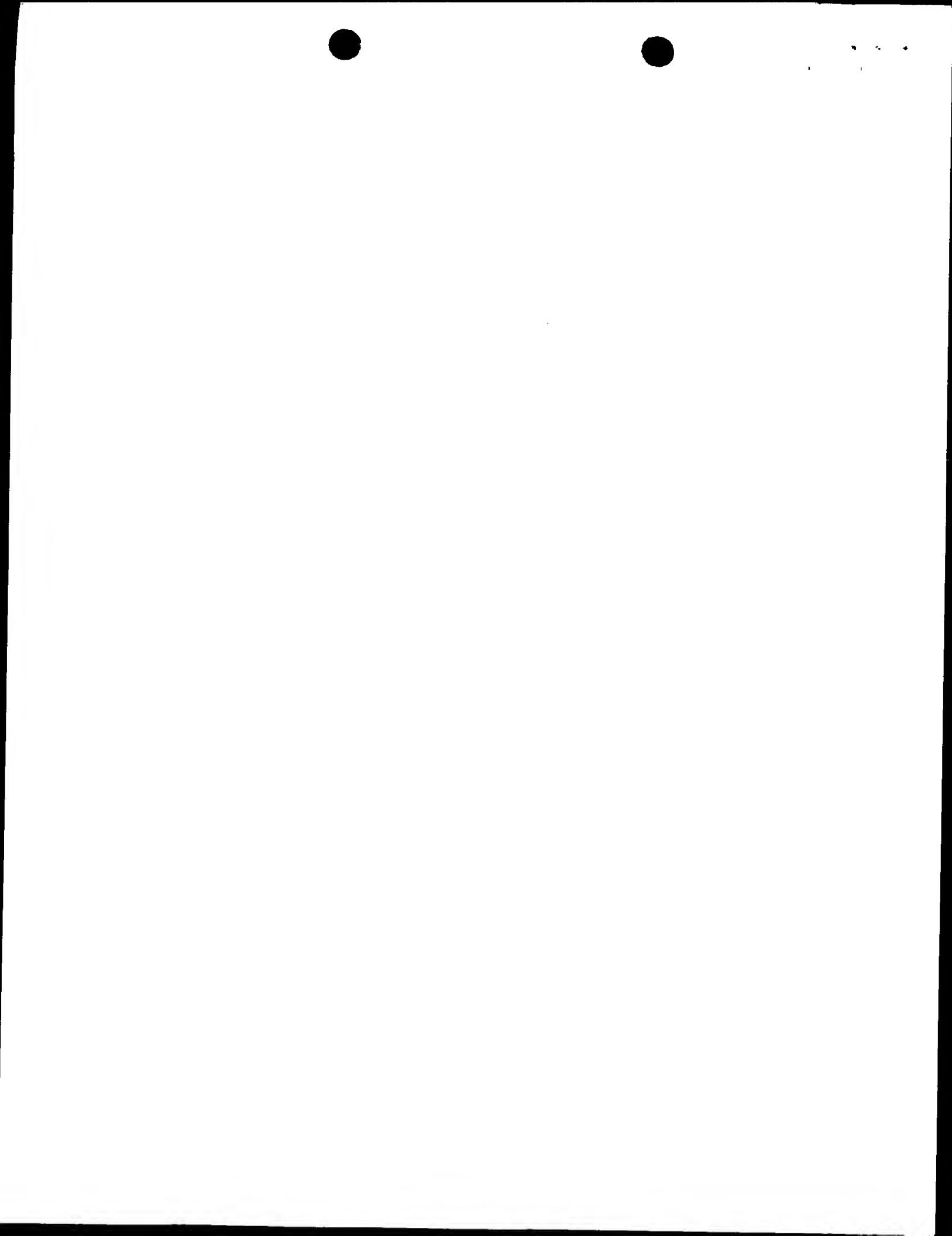


PCT/DE98/03155

K 2607 - hu/msl

**Patentansprüche**

- 5        1. Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, wobei das Protein zumindest eine der in Fig. 1 angegebenen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II umfaßt und durch die DNA von Fig. 2.1, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6 oder 2.7 bzw. durch eine mit dieser DNA über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA kodiert wird.
- 10      2. DNA, kodierend für das Protein nach Anspruch 1, wobei die DNA jene von Fig. 2.1, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6 oder 2.7 bzw. eine mit dieser DNA über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA ist.
- 15      3. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 2.
4. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 3.
5. Verfahren zur Herstellung des Proteins nach Anspruch 1, umfassend die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 4 unter geeigneten Bedingungen.
- 20      6. Antikörper, gerichtet gegen das Protein nach Anspruch 5.
7. Verwendung eines Proteins, das zumindest eine der in Fig. 1 angegebenen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II umfaßt, bzw. eine für ein solches Protein kodierende DNA zum diagnostischen und/oder therapeutischen Eingreifen in den wnt-Signalweg.



**VERTRÄG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

**PCT**

An  
**HUBER, Bernard**  
 Huber & Schüssler  
 Truderinger Strasse 246  
 D-81825 München  
 GERMANY

INTERNATIONALES AKTENZEICHEN
25. NOV. 1998
23.05.99

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERMITTLUNG DES  
INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS  
ODER DER ERKLÄRUNG

(Regel 44.1 PCT)

Absendedatum  
(Tag/Monat/Jahr) **23/03/1999**

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts  
**K 2607 - hu/ms1**

WEITERES VORGEHEN siehe Punkte 1 und 4 unten

Internationales Aktenzeichen  
**PCT/DE 98/ 03155**

Internationales Anmeldedatum  
(Tag/Monat/Jahr) **27/10/1998**

Anmelder

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG . . et al.**

1.  Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationale Recherchenbericht erstellt wurde und ihm hiermit übermittelt wird.

**Einreichung von Änderungen und einer Erklärung nach Artikel 19:**  
Der Anmelder kann auf eigenen Wunsch die Ansprüche der internationalen Anmeldung ändern (siehe Regel 46):

**Bis wann sind Änderungen einzureichen?**

Die Frist zur Einreichung solcher Änderungen beträgt üblicherweise zwei Monate ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts; weitere Einzelheiten sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

**Wo sind Änderungen einzureichen?**

Unmittelbar beim Internationalen Büro der WIPO, 34, CHEMIN des Colombettes, CH-1211 Genf 20,  
Telefaxnr.: (41-22) 740.14.35

Nähere Hinweise sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

2.  Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird und daß ihm hiermit die Erklärung nach Artikel 17(2)a übermittelt wird.

3.  **Hinsichtlich des Widerspruchs** gegen die Entrichtung einer zusätzlichen Gebühr (zusätzlicher Gebühren) nach Regel 40.2 wird dem Anmelder mitgeteilt, daß

der Widerspruch und die Entscheidung hierüber zusammen mit seinem Antrag auf Übermittlung des Wortlauts sowohl des Widerspruchs als auch der Entscheidung hierüber an die Bestimmungsämter dem Internationalen Büro übermittelt worden sind.

noch keine Entscheidung über den Widerspruch vorliegt; der Anmelder wird benachrichtigt, sobald eine Entscheidung getroffen wurde.

4. **Weiteres Vorgehen:** Der Anmelder wird auf folgendes aufmerksam gemacht:

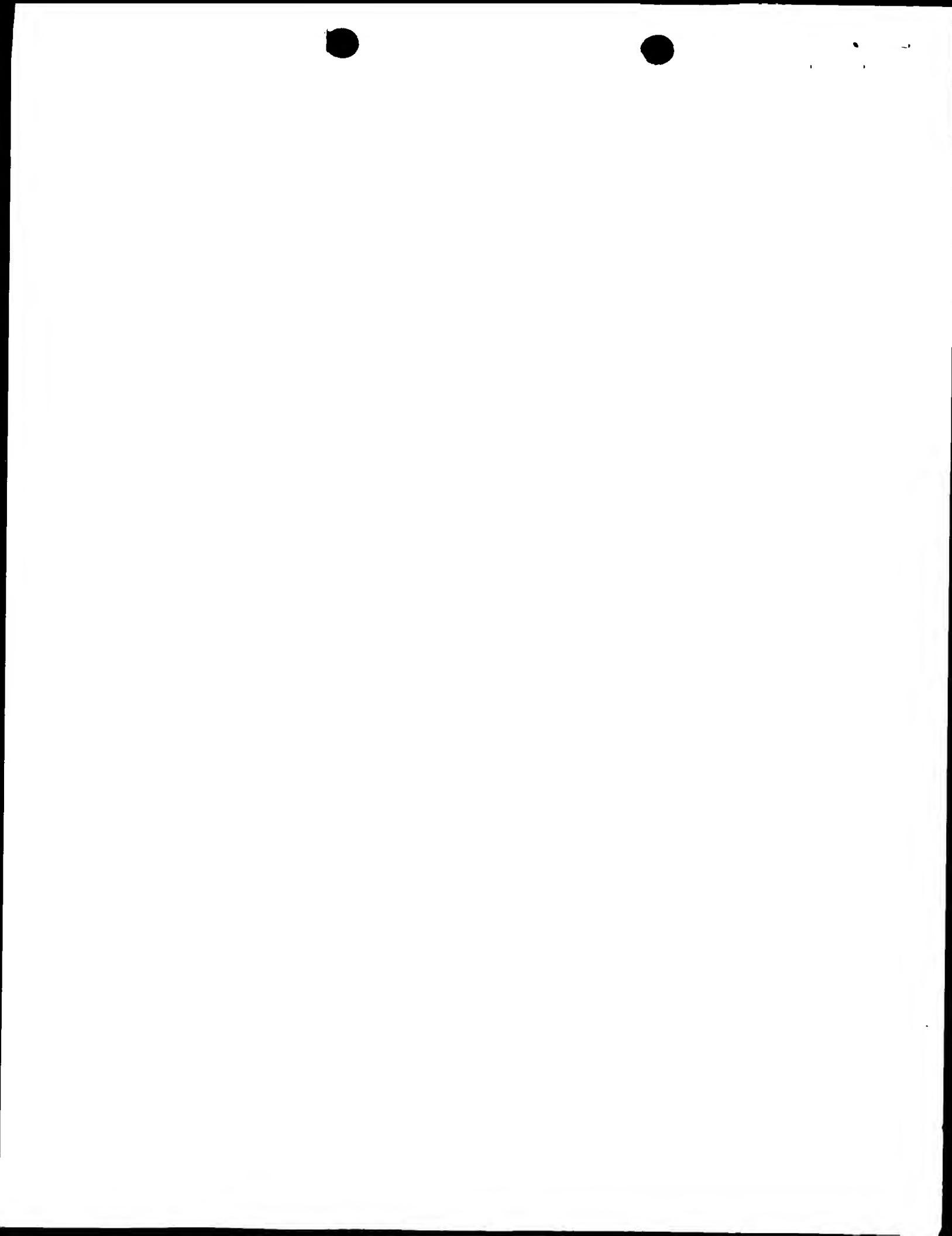
Kurz nach Ablauf von **18 Monaten** seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht. Will der Anmelder die Veröffentlichung verhindern oder auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, so muß gemäß Regel 90 bis bzw. 90<sup>bis</sup>.3 vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung eine Erklärung über die Zurücknahme der internationalen Anmeldung oder des Prioritätsanspruchs beim Internationalen Büro eingehen.

Innerhalb von **19 Monaten** seit dem Prioritätsdatum ist ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung einzureichen, wenn der Anmelder den Eintritt in die nationale Phase bis zu 30 Monaten seit dem Prioritätsdatum (in manchen Ämtern sogar noch länger) verschieben möchte.

Innerhalb von **20 Monaten** seit dem Prioritätsdatum muß der Anmelder die für den Eintritt in die nationale Phase vorgeschriebenen Handlungen vor allen Bestimmungsämtern vornehmen, die nicht innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum in der Anmeldung oder einer nachträglichen Auswahlerklärung ausgewählt wurden oder nicht ausgewählt werden konnten, da sie für sie Kapitel II des Vertrages nicht verbindlich ist.

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL-2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter  
**Mireille Claudepierre**



## ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220

Diese Anmerkungen sollen grundlegende Hinweise zur Einreichung von Änderungen gemäß Artikel 19 geben. Diesen Anmerkungen liegen die Erfordernisse des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), der Ausführungsordnung und der Verwaltungsrichtlinien zu diesem Vertrag zugrunde. Bei Abweichungen zwischen diesen Anmerkungen und obengenannten Texten sind letztere maßgebend. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, einer Veröffentlichung der WIPO, zu entnehmen.  
Die in diesen Anmerkungen verwendeten Begriffe "Artikel", "Regel" und "Abschnitt" beziehen sich jeweils auf die Bestimmungen des PCT-Vertrags, der PCT-Ausführungsordnung bzw. der PCT-Verwaltungsrichtlinien.

### HINWEISE ZU ÄNDERUNGEN GEMÄSS ARTIKEL 19

Nach Erhalt des internationalen Recherchenberichts hat der Anmelder die Möglichkeit, einmal die Ansprüche der internationalen Anmeldung zu ändern. Es ist jedoch zu betonen, daß, da alle Teile der internationalen Anmeldung (Ansprüche, Beschreibung und Zeichnungen) während des internationalen vorläufigen Prüfungsverfahrens geändert werden können, normalerweise keine Notwendigkeit besteht, Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 einzureichen, außer wenn der Anmelder z.B. zum Zwecke eines vorläufigen Schutzes die Veröffentlichung dieser Ansprüche wünscht oder ein anderer Grund für eine Änderung der Ansprüche vor ihrer internationalen Veröffentlichung vorliegt. Weiterhin ist zu beachten, daß ein vorläufiger Schutz nur in einigen Staaten erhältlich ist.

#### Welche Teile der internationalen Anmeldung können geändert werden?

Im Rahmen von Artikel 19 können nur die Ansprüche geändert werden.

In der internationalen Phase können die Ansprüche auch nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert (oder nochmals geändert) werden. Die Beschreibung und die Zeichnungen können nur nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert werden.

Beim Eintritt in die nationale Phase können alle Teile der internationalen Anmeldung nach Artikel 28 oder gegebenenfalls Artikel 41 geändert werden.

#### Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Innerhalb von zwei Monaten ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts oder innerhalb von sechzehn Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft. Die Änderungen gelten jedoch als rechtzeitig eingereicht, wenn sie dem Internationalen Büro nach Ablauf der maßgebenden Frist, aber noch vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung (Regel 46.1) zugehen.

#### Wo sind die Änderungen nicht einzureichen?

Die Änderungen können nur beim Internationalen Büro, nicht aber beim Anmeldeamt oder der Internationalen Recherchenbehörde eingereicht werden (Regel 46.2).

Falls ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung eingereicht wurde/wird, siehe unten.

#### In welcher Form können Änderungen erfolgen?

Eine Änderung kann erfolgen durch Streichung eines oder mehrerer ganzer Ansprüche, durch Hinzufügung eines oder mehrerer neuer Ansprüche oder durch Änderung des Wortlauts eines oder mehrerer Ansprüche in der eingereichten Fassung.

Für jedes Anspruchsbilatt, das sich aufgrund einer oder mehrerer Änderungen von dem ursprünglich eingereichten Blatt unterscheidet, ist ein Ersatzblatt einzureichen.

Alle Ansprüche, die auf einem Ersatzblatt erscheinen, sind mit arabischen Ziffern zu numerieren. Wird ein Anspruch gestrichen, so brauchen, die anderen Ansprüche nicht neu numeriert zu werden. Im Fall einer Neunumerierung sind die Ansprüche fortlaufend zu numerieren (Verwaltungsrichtlinien, Abschnitt 205 b)).

Die Änderungen sind in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

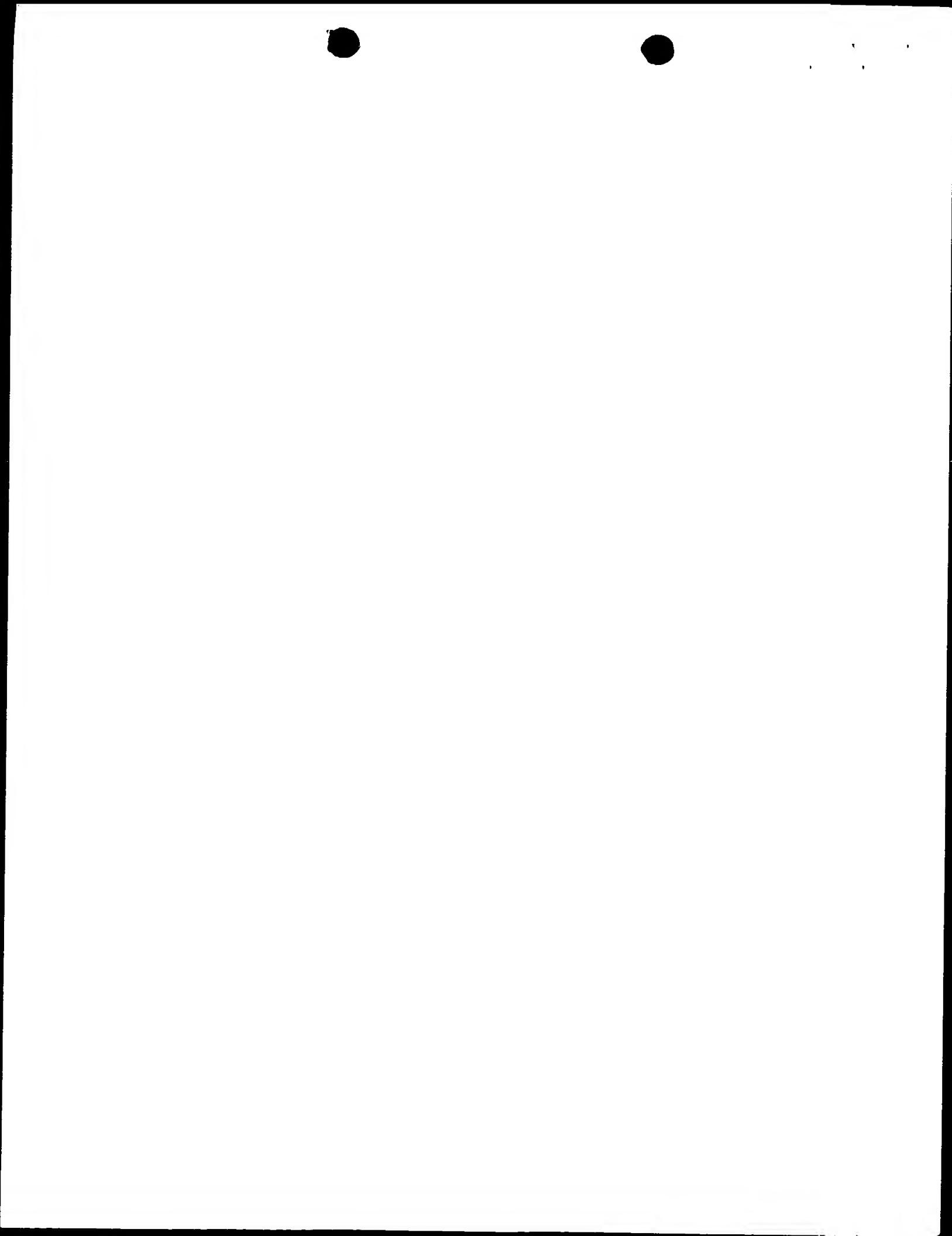
#### Welche Unterlagen sind den Änderungen beizufügen?

##### Begleitschreiben (Abschnitt 205 b)):

Die Änderungen sind mit einem Begleitschreiben einzureichen.

Das Begleitschreiben wird nicht zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht. Es ist nicht zu verwechseln mit der "Erklärung nach Artikel 19(1)" (siehe unten, "Erklärung nach Artikel 19 (1)").

Das Begleitschreiben ist nach Wahl des Anmelders in englischer oder französischer Sprache abzufassen. Bei englischsprachigen internationalen Anmeldungen ist das Begleitschreiben aber ebenfalls in englischer, bei französischsprachigen internationalen Anmeldungen in französischer Sprache abzufassen.



## ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220 (Fortsetzung)

Im Begleitschreiben sind die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen anzugeben. So ist insbesondere zu jedem Anspruch in der internationalen Anmeldung anzugeben (gleichlautende Angaben zu verschiedenen Ansprüchen können zusammengefaßt werden), ob

- i) der Anspruch unverändert ist;
- ii) der Anspruch gestrichen worden ist;
- iii) der Anspruch neu ist;
- iv) der Anspruch einen oder mehrere Ansprüche in der eingereichten Fassung ersetzt;
- v) der Anspruch auf die Teilung eines Anspruchs in der eingereichten Fassung zurückzuführen ist.

Im folgenden sind Beispiele angegeben, wie Änderungen im Begleitschreiben zu erläutern sind:

1. [Wenn anstelle von ursprünglich 48 Ansprüchen nach der Änderung einiger Ansprüche 51 Ansprüche existieren]:  
"Die Ansprüche 1 bis 29, 31, 32, 34, 35, 37 bis 48 werden durch geänderte Ansprüche gleicher Numerierung ersetzt; Ansprüche 30, 33 und 36 unverändert; neue Ansprüche 49 bis 51 hinzugefügt."
2. [Wenn anstelle von ursprünglich 15 Ansprüchen nach der Änderung aller Ansprüche 11 Ansprüche existieren]:  
"Geänderte Ansprüche 1 bis 11 treten an die Stelle der Ansprüche 1 bis 15."
3. [Wenn ursprünglich 14 Ansprüche existierten und die Änderungen darin bestehen, daß einige Ansprüche gestrichen werden und neue Ansprüche hinzugefügt werden]:  
Ansprüche 1 bis 6 und 14 unverändert; Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt."Oder" Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt; alle übrigen Ansprüche unverändert."
4. [Wenn verschiedene Arten von Änderungen durchgeführt werden]:  
"Ansprüche 1-10 unverändert; Ansprüche 11 bis 13, 18 und 19 gestrichen; Ansprüche 14, 15 und 16 durch geänderten Anspruch 14 ersetzt; Anspruch 17 in geänderte Ansprüche 15, 16 und 17 unterteilt; neue Ansprüche 20 und 21 hinzugefügt."

### "Erklärung nach Artikel 19(1)" (Regel 46.4)

Den Änderungen kann eine Erklärung beigefügt werden, mit der die Änderungen erläutert und ihre Auswirkungen auf die Beschreibung und die Zeichnungen dargelegt werden (die nicht nach Artikel 19 (1) geändert werden können).

Die Erklärung wird zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht.

Sie ist in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Sie muß kurz gehalten sein und darf, wenn in englischer Sprache abgefaßt oder ins Englische übersetzt, nicht mehr als 500 Wörter umfassen.

Die Erklärung ist nicht zu verwechseln mit dem Begleitschreiben, das auf die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen hinweist, und ersetzt letzteres nicht. Sie ist auf einem gesonderten Blatt einzureichen und in der Überschrift als solche zu kennzeichnen, vorzugsweise mit den Worten "Erklärung nach Artikel 19 (1)".

Die Erklärung darf keine herabsetzenden Äußerungen über den internationalen Recherchenbericht oder die Bedeutung von in dem Bericht angeführten Veröffentlichungen enthalten. Sie darf auf im internationalen Recherchenbericht angeführte Veröffentlichungen, die sich auf einen bestimmten Anspruch beziehen, nur im Zusammenhang mit einer Änderung dieses Anspruchs Bezug nehmen.

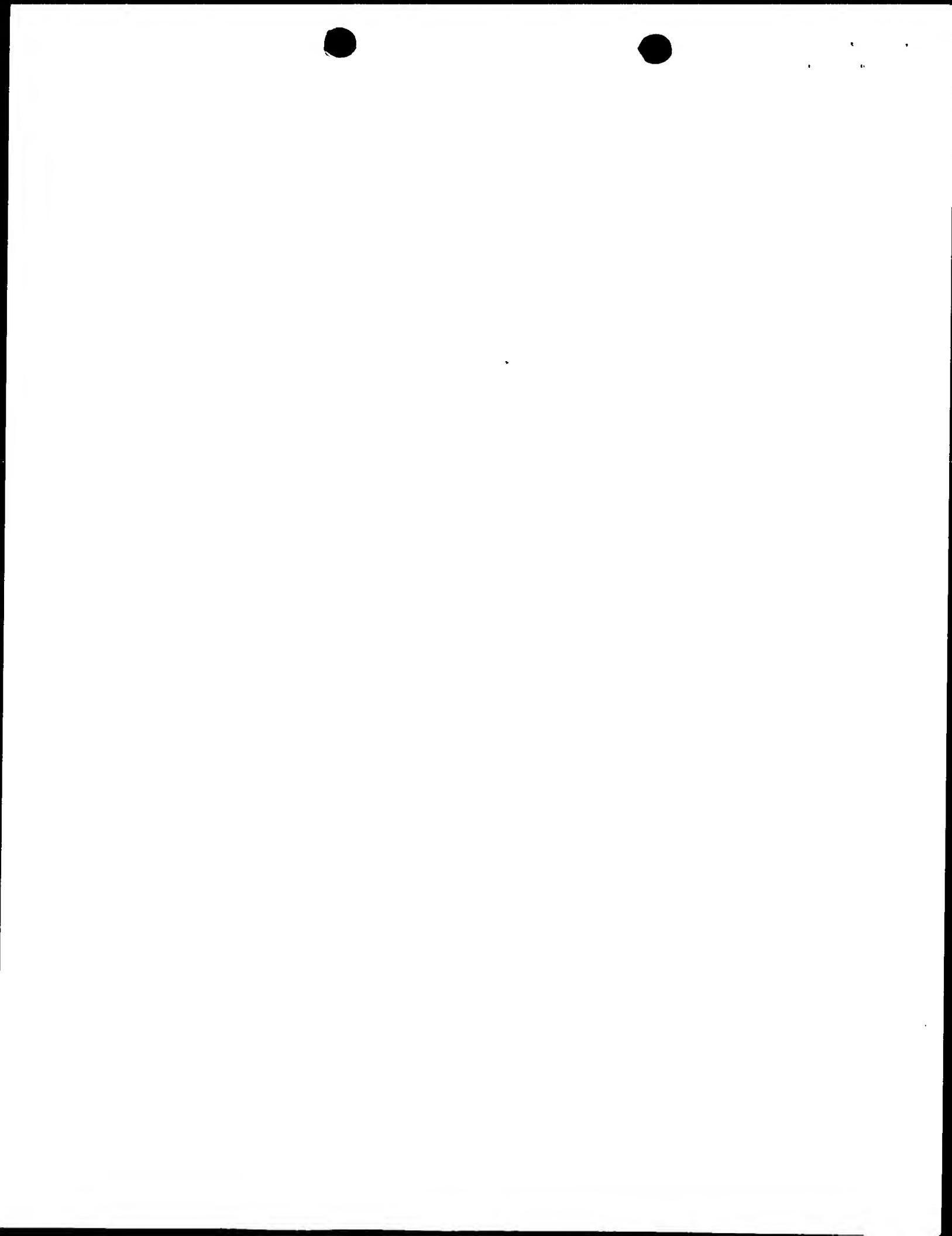
### Auswirkungen eines bereits gestellten Antrags auf internationale vorläufige Prüfung

Ist zum Zeitpunkt der Einreichung von Änderungen nach Artikel 19 bereits ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung gestellt worden, so sollte der Anmelder in seinem Interesse gleichzeitig mit der Einreichung der Änderungen beim Internationalem Büro auch eine Kopie der Änderungen bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde einreichen (siehe Regel 62.2 a), erster Satz).

### Auswirkungen von Änderungen hinsichtlich der Übersetzung der internationalen Anmeldung beim Eintritt in die nationale Phase

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß bei Eintritt in die nationale Phase möglicherweise anstatt oder zusätzlich zu der Übersetzung der Ansprüche in der eingereichten Fassung eine Übersetzung der nach Artikel 19 geänderten Ansprüche an die bestimmten/ausgewählten Ämter zu übermitteln ist.

Nähere Einzelheiten über die Erfordernisse jedes bestimmten/ausgewählten Amtes sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.



**VERTRÄGE ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

**PCT**

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>K 2607 - hu/msl</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b>	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/DE 98/03155</b>	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) <b>27/10/1998</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>27/10/1997</b>
Anmelder <b>DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG . . et al.</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

**1. Grundlage des Berichts**

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.
- Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.
- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
- in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2.  Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3.  Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

**4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung**

- wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

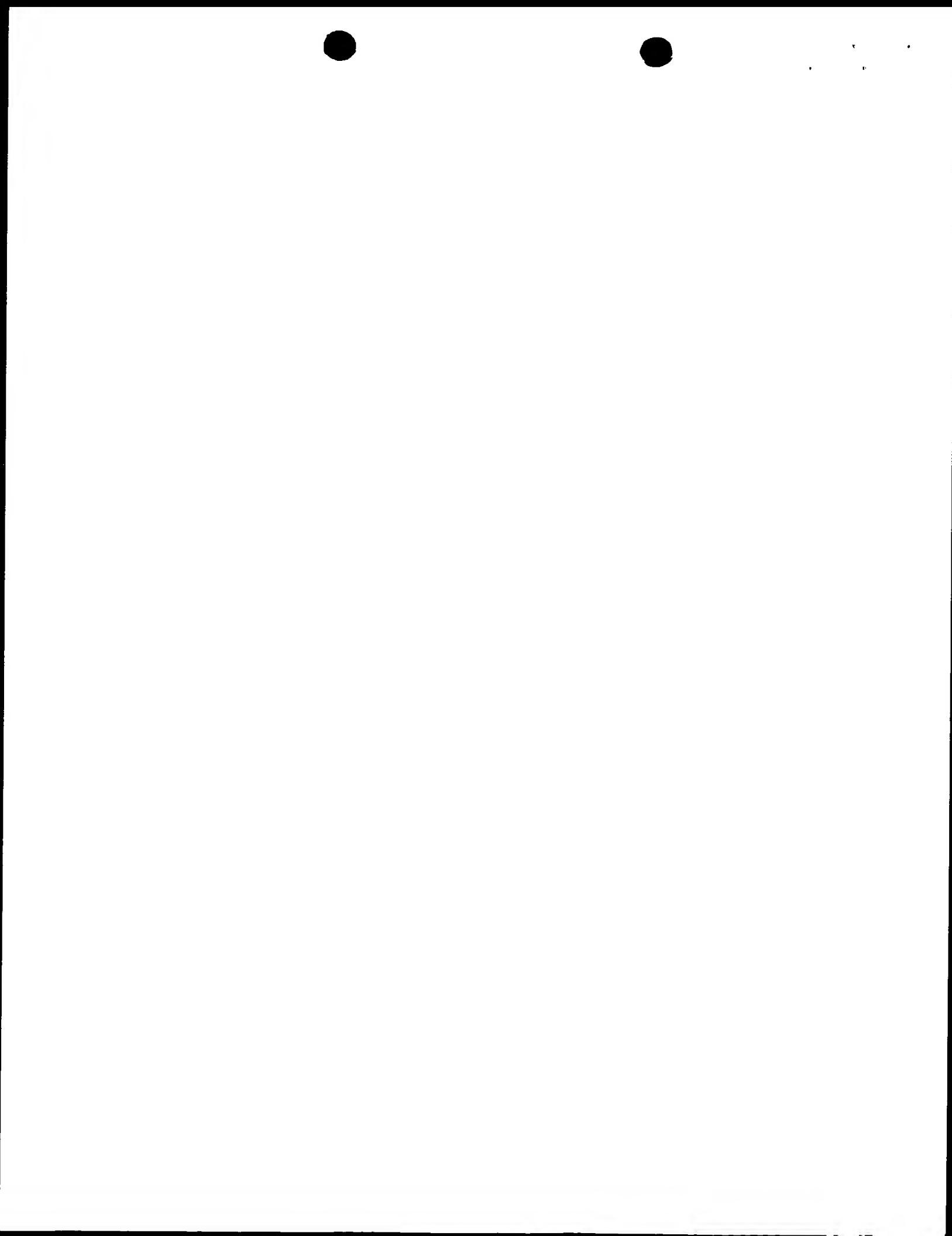
**5. Hinsichtlich der Zusammenfassung**

- wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

**6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. \_\_\_\_\_**

- wie vom Anmelder vorgeschlagen
- weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
- weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

keine der Abb.



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/03155

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 9,10, insoweit bezogen auf ein in Vivo Verfahren sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2.  Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3.  Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

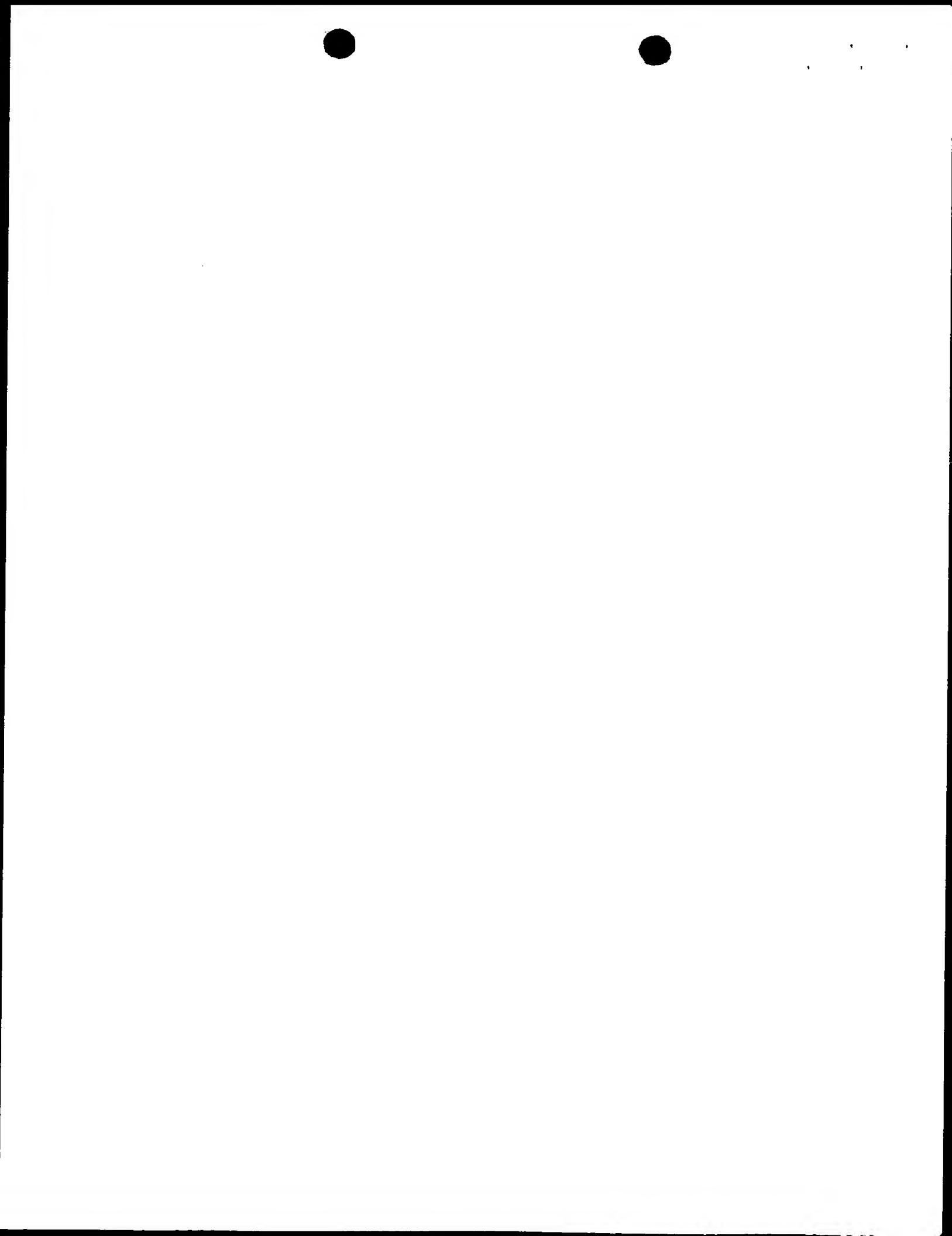
## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

### Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.



"Der Antrag ist bei der zuständigen mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde oder, wenn zwei oder mehr Behörden zuständig sind, bei der vom Anmelder gewählten Behörde einzureichen. Der Anmelder kann den Namen oder den Zweibuchstaben-Code der Behörde auf der nachstehenden Zeile angeben.

IPEA/

PCT

KAPITEL II

## ANTRAG AUF INTERNATIONALE VORLÄUFIGE PRÜFUNG

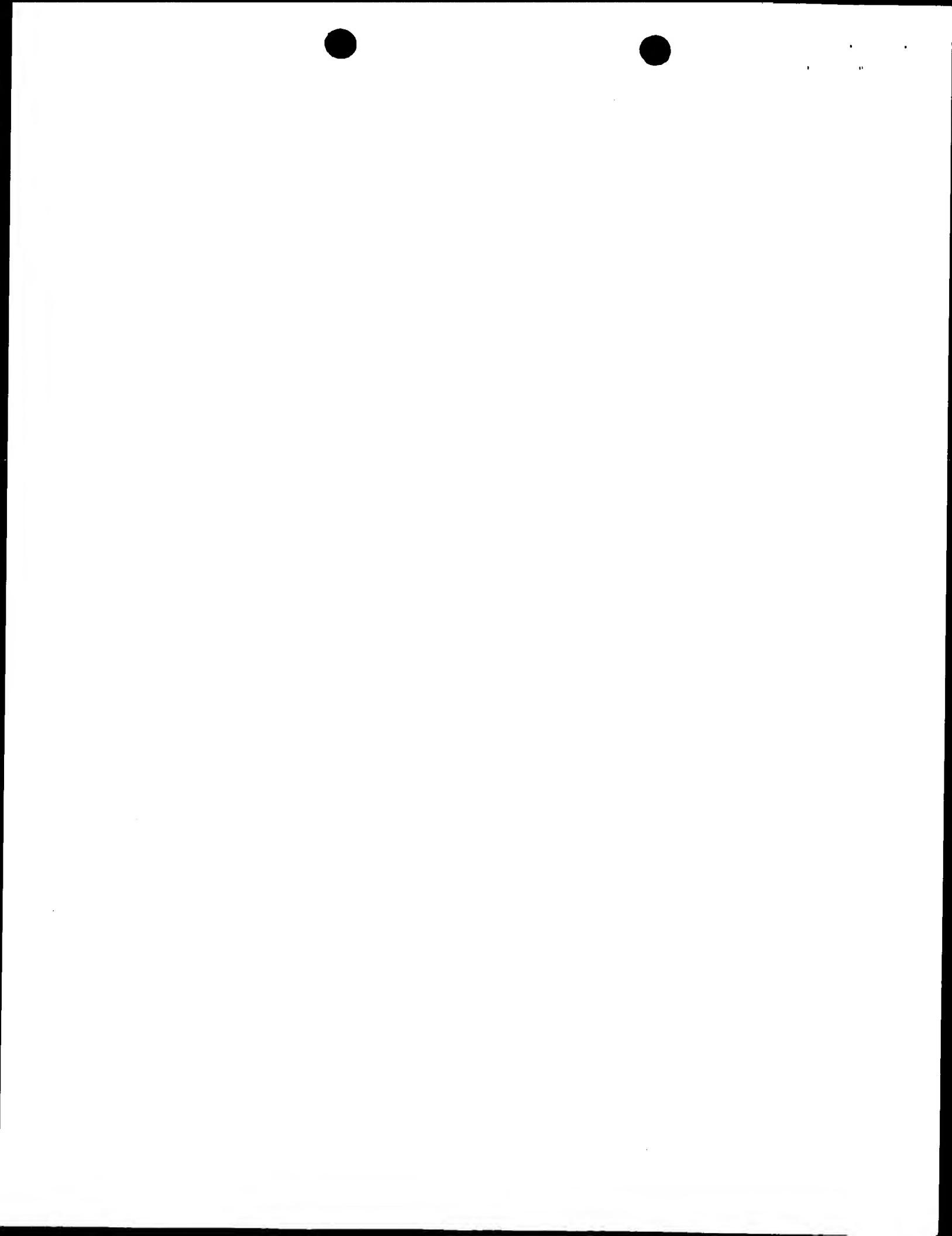
nach Artikel 31 des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens:  
Der (die) Unterzeichnete(n) beantragt (beantragen), daß für die nachstehend bezeichnete internationale Anmeldung  
die internationale vorläufige Prüfung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem  
Gebiet des Patentwesens durchgeführt wird.

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

Bezeichnung der IPEA

Eingangsdatum des ANTRAGS

Feld Nr. I KENNZEICHNUNG DER INTERNATIONALEN ANMELDUNG		Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2607 - hu/km
Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/03155	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) 27.10.1998	(Frühester) Prioritätstag (Tag/Monat/Jahr) 27.10.1997
Bezeichnung der Erfindung Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs		
Feld Nr. II ANMELDER		
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)  Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts Im Neuenheimer Feld 280  D-69120 Heidelberg	Telefonnr.:	Telefaxnr.:
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	Fernschreibnr.:
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)  NIEHRS, Christof Klingenteichstr. 6b  D-69117 Heidelberg		
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)  GLINKA, Andrei Erlenweg 22  D-69126 Heidelberg		
Staatsangehörigkeit (Staat): RU	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
<input type="checkbox"/> Weitere Anmelder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.		



**Feld Nr. III ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT**

Die folgende Person ist  Anwalt  gemeinsamer Vertreter  
 und  ist vom (von den) Anmelder(n) bereits früher bestellt worden und vertritt ihn (sie) auch für die internationale vorläufige Prüfung.  
 wird hiermit bestellt: eine etwaige frühere Bestellung eines Anwalts/gemeinsamen Vertreters wird hiermit widerrufen.  
 wird hiermit zusätzlich zu dem bereits früher bestellten Anwalt/gemeinsamen Vertreter, nur für das Verfahren vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde bestellt.

Name und Anschrift: <i>(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staates anzugeben.)</i>	Telefonnr.: 089/427 247 48
SCHÜSSLER, Andrea Huber & Schüßler Truderinger Str. 246 81825 München	Telexnr.: 089/427 247 49
	Fernschreibnr.:

Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellschrift angegeben wird.

**Feld Nr. IV ERKLÄRUNG BETREFFEND ÄNDERUNGEN**

Der Anmelder wünscht, daß die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde\*

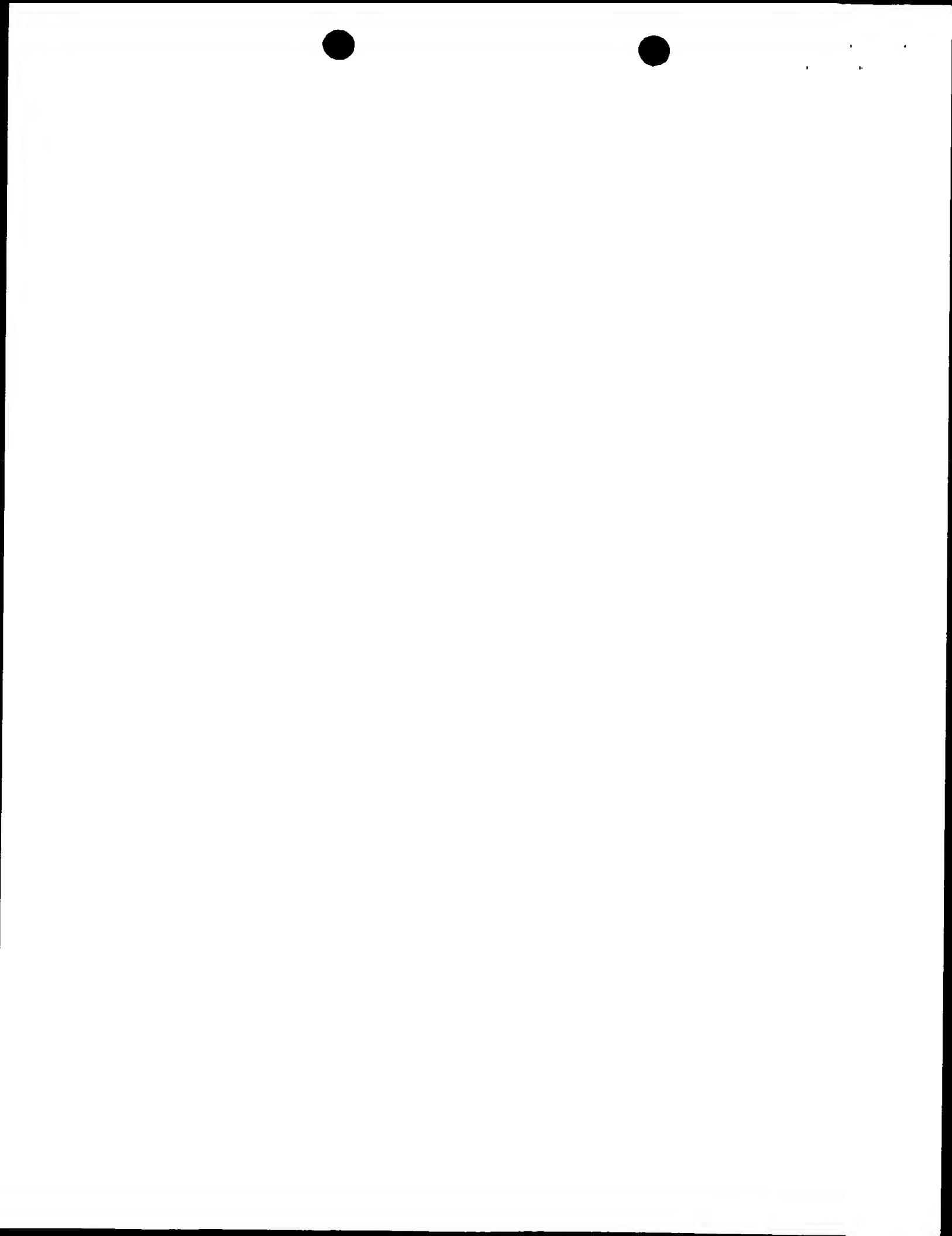
- i)  die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung aufnimmt.
- ii)  die Änderungen nach Artikel 34
  - der Beschreibung (Änderungen liegen bei)
  - der Ansprüche (Änderungen liegen bei)
  - der Zeichnungen (Änderungen liegen bei)
 berücksichtigt.
- iii)  die beim Internationalen Büro eingereichten Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 berücksichtigt (Kopie liegt bei).
- iv)  die Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 nicht berücksichtigt, sondern als überholt ansieht.
- v)  den Beginn der internationalen vorläufigen Prüfung bis zum Ablauf von 20 Monaten ab dem Prioritätsdatum aufschiebt, sofern die Behörde nicht eine Kopie nach Artikel 19 vorgenommener Änderungen oder eine Erklärung des Anmelders erhält, daß er keine solchen Änderungen vornehmen will (Regel 69.1 d)). *(Dieses Kästchen darf nur angekreuzt werden, wenn die Frist nach Artikel 19 noch nicht abgelaufen ist.)*

\* Wenn kein Kästchen angekreuzt wird, wird mit der internationalen vorläufigen Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung begonnen; wenn eine Kopie der Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 und/oder Änderungen der internationalen Anmeldung nach Artikel 34 bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde eingeht, bevor diese mit der Erstellung eines schriftlichen Bescheids oder des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts begonnen hat, wird jedoch die geänderte Fassung verwendet.

**Feld Nr. V BENENNUNG VON STAATEN ALS AUSGEWÄHLTE STAATEN**

Der Anmelder benennt als ausgewählte Staaten alle auswählbaren Staaten (*das heißt, alle Staaten, die bestimmt wurden und durch Kapitel II des PCT gebunden sind*) ausgenommen .....

*(Möchte der Anmelder bestimmte Staaten nicht auswählen, sind die Namen oder Zweibuchstaben-Codes dieser Staaten auf den obenstehenden Zeilen anzugeben.)*



**Feld Nr. VI KONTROLLISTE**

Dem Antrag liegen folgende Unterlagen für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung bei:

## 1. Änderungen nach Artikel 34

Beschreibung : Blätter  
Ansprüche : Blätter  
Zeichnungen : Blätter

## 2. Begleitschreiben zu den Änderungen nach Artikel 34

## 3. Kopie der Änderungen nach Artikel 19

## 4. Kopie einer Erklärung nach Artikel 19

## 5. Sonstige (einzelnen aufzuführen) :

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen  
erhalten nicht erhalten

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Dem Antrag liegen außerdem die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

1.  unterzeichnete gesonderte Vollmacht  
2.  Kopie der allgemeinen Vollmacht  
3.  Begründung für das Fehlen der Unterschrift

4.  Blatt für die Gebührenberechnung  
5.  sonstige (einzelnen aufzuführen):  
Scheck Nr. 312765089

**Feld Nr. VII UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS, ANWALTS ODER GEMEINSAMEN VERTRETER**

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

München, 25. Mai 1999

Dr. Andrea Schüßler  
Patentanwältin

— Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen —

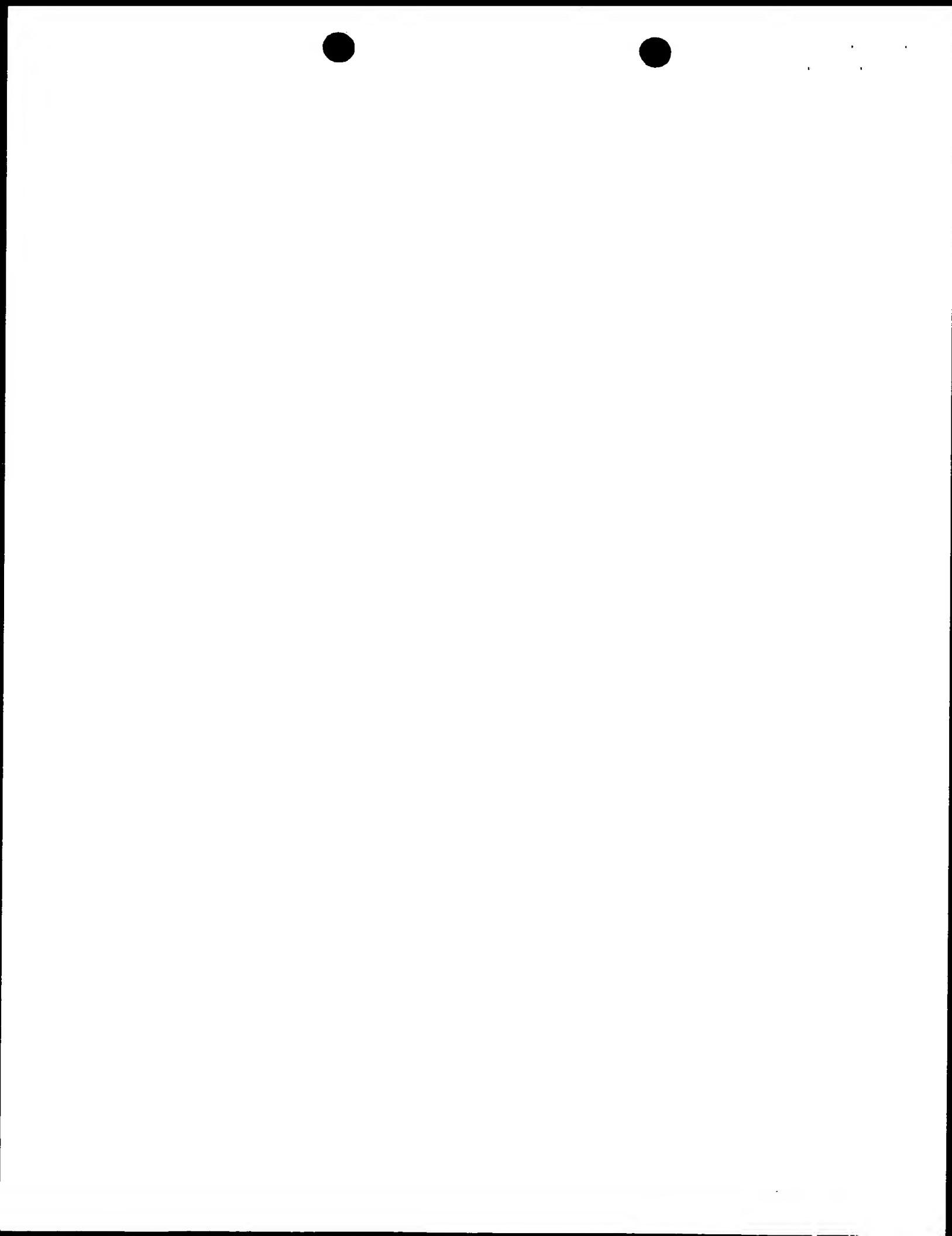
## 1. Datum des tatsächlichen Eingangs des ANTRAGS:

## 2. Geändertes Eingangsdatum des Antrags aufgrund von BERICHTIGUNGEN nach Regel 60.1.b):

3.  Eingangsdatum des Antrags NACH Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum: Punkt 4 und Punkt 5, unten, finden keine Anwendung.  Der Anmelder wurde entsprechend unterrichtet
4.  Eingangsdatum des Antrags INNERHALB 19 Monate ab Prioritätsdatum wegen Fristverlängerung nach Regel 80.5.
5.  Das Eingangsdatum des Antrags liegt nach Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum, der verspätete Eingang ist aber nach Regel 82 ENTSCHULDIGT.

— Vom Internationalen Büro auszufüllen —

Antrag vom IPEA erhalten am:



**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM  
GEBIET DES PATENTWESENS**

**PCT**

REC'D 26 JAN 2000

WIPO PCT

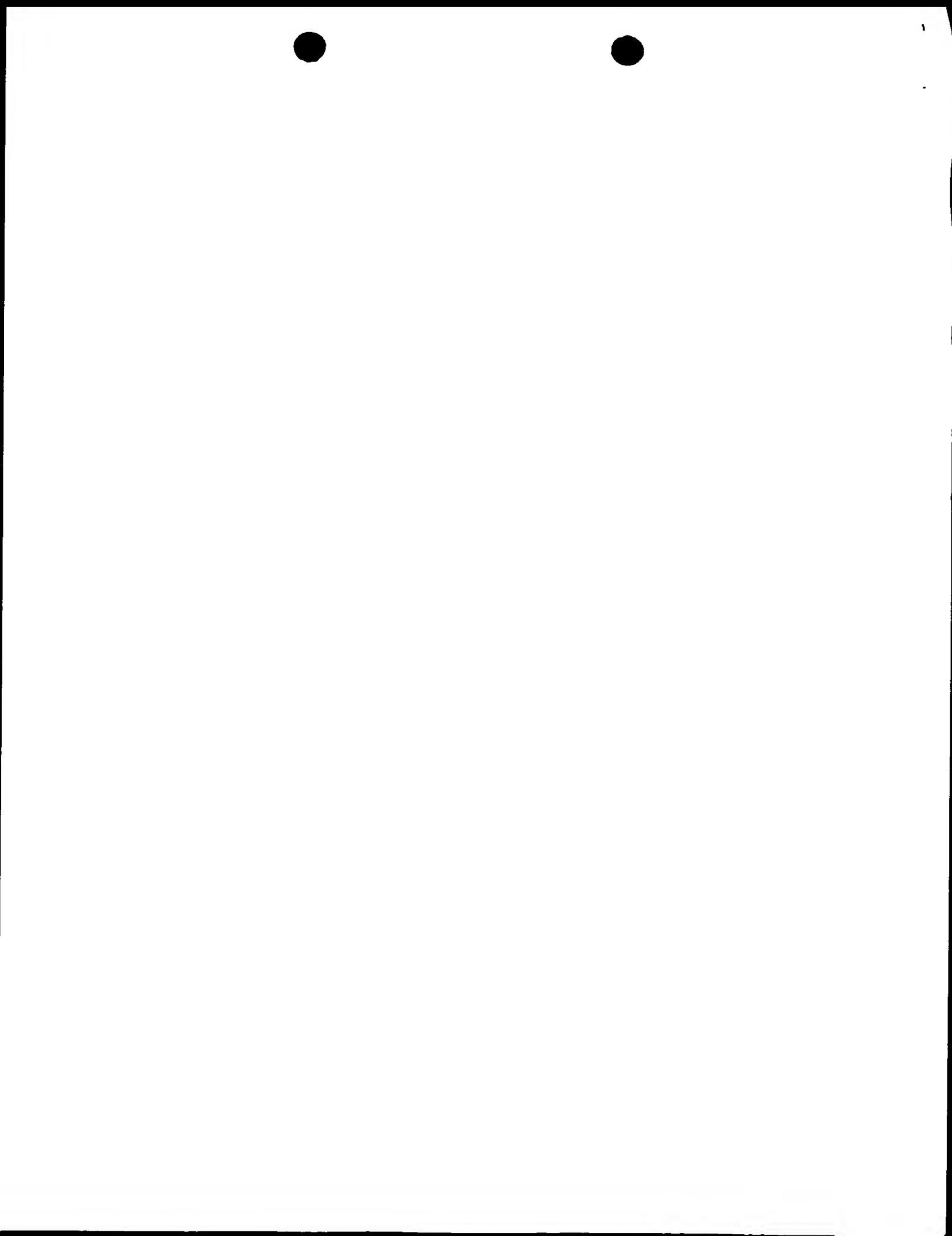
**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT**

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts  K 2607 - hu/km	<b>WEITERES VORGEHEN</b>	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen  PCT/DE98/03155	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)  27/10/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag)  27/10/1997
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK  C12N15/18		
Anmelder  DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM ... et al		
<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfasst insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt 1 Blätter.</p>		
<p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>I    <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts</li> <li>II    <input type="checkbox"/> Priorität</li> <li>III    <input checked="" type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit</li> <li>IV    <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung</li> <li>V    <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderliche Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung</li> <li>VI    <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen</li> <li>VII    <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung</li> <li>VIII    <input type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung</li> </ul>		

Datum der Einreichung des Antrags  25/05/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  20.01.00
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Vollbach, S  Tel. Nr. +49 89 2399 8715





**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER  
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/03155

**I. Grundlage des Berichts**

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

**Beschreibung, Seiten:**

1-11                    ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-7                    mit Telefax vom                    23/12/1999

**Zeichnungen, Blätter:**

1/11-11/11            ursprüngliche Fassung

**2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:**

- Beschreibung,            Seiten:
- Ansprüche,            Nr.:
- Zeichnungen,            Blatt:

**3.  Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):**

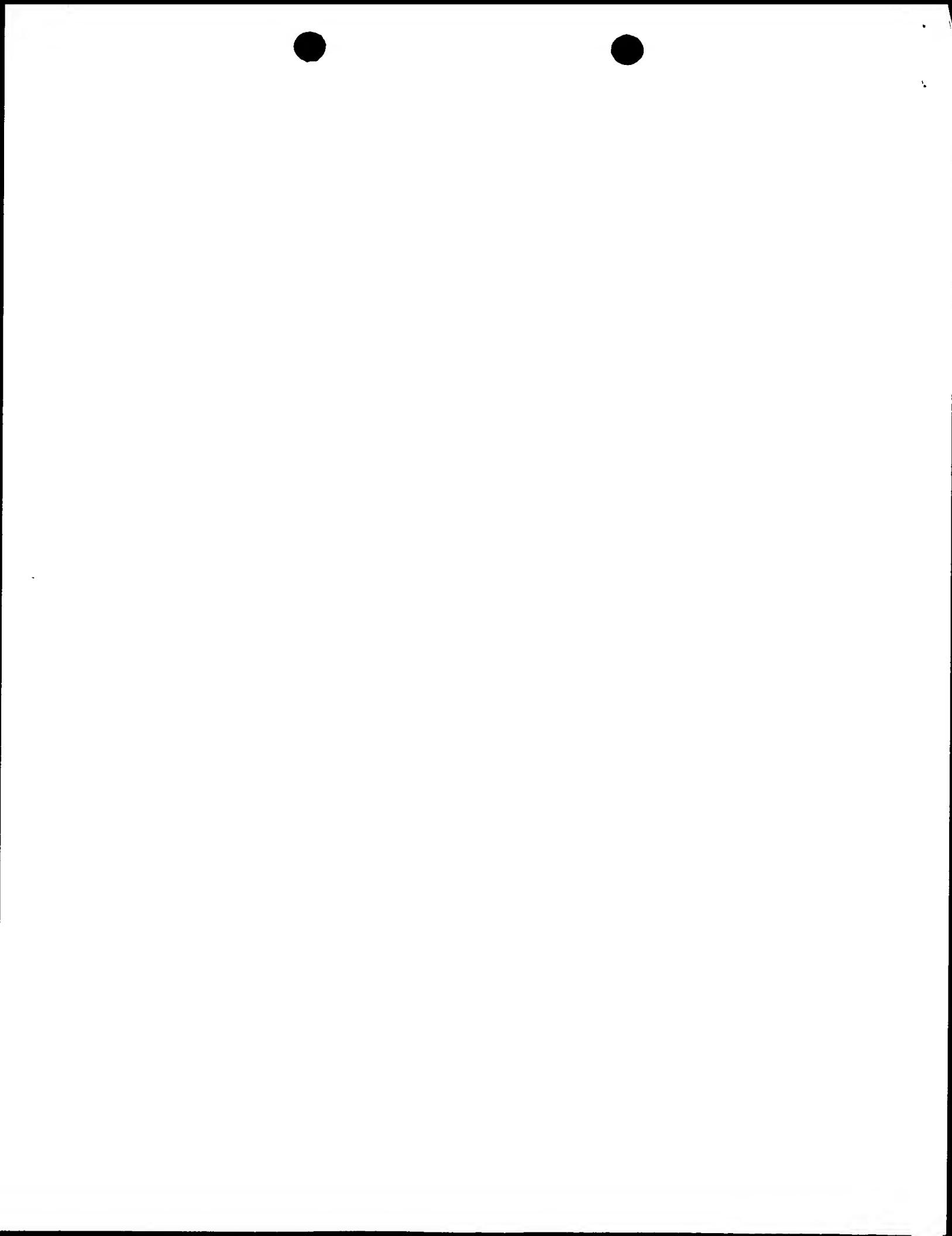
**4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:**

**III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit**

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- die gesamte internationale Anmeldung.
- Ansprüche Nr. 7.

**Begründung:**



**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER  
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/03155

- Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
- Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 7 sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

**1. Feststellung**

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-6
	Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche 1-6
	Nein: Ansprüche
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-6
	Nein: Ansprüche

**2. Unterlagen und Erklärungen**

**siehe Beiblatt**

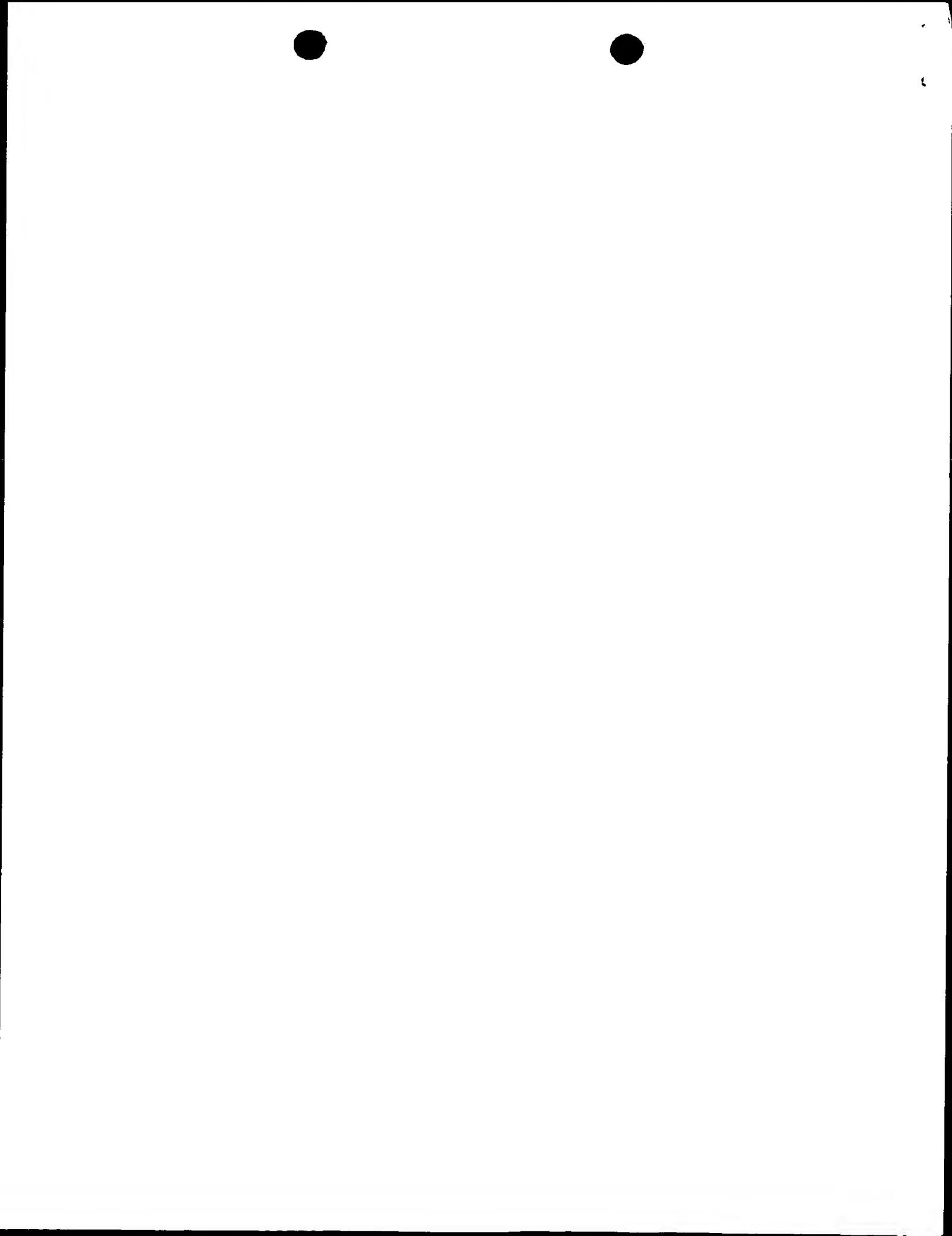


1. Die vorliegende Anmeldung betrifft sechs spezifische Inhibitoren des wnt-Signalweges, die DNA, die diese Inhibitoren kodierende DNA, Antikörper und die Verwendung der Inhibitoren.

Obwohl im Stand der Technik bereits Inhibitoren des wnt Signalweges bereits beschrieben sind (D1: Int. J. Biol., vol. 40:531-535, 1996, D2: Nature, vol. 389, 2.10.1997), sind die beanspruchten Inhibitoren unterschiedlich und nicht in naheliegender Weise herleitbar aus diesem Stand der Technik. Daher entsprechen die Ansprüche 1-6 den Erfordernissen der Artikel 33(2) und 33(3) PCT.

2. Anspruch 7 ist wie folgt zu beanstanden:

In der Anmeldung werden keine experimentellen Daten geliefert, daß die isolierten Klone tatsächlich Verwendung finden in der Diagnostik und Therapie. Tatsächlich ist noch nicht einmal die Expression der Klone (ausgenommen des Klones 2.6 phdk-1) gezeigt worden. Eine potentielle Verwendung selbst der spezifischen Klone ist somit völlig spekulativ. Folglich gibt es auch keine Stützung für die Verwendung der Proteine in der verbreiterten Form d.h. definiert über die Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II. Daher entspricht der Anspruch 7 nicht den Erfordernissen der Artikel 5 und 6 PCT.



16. November 1999

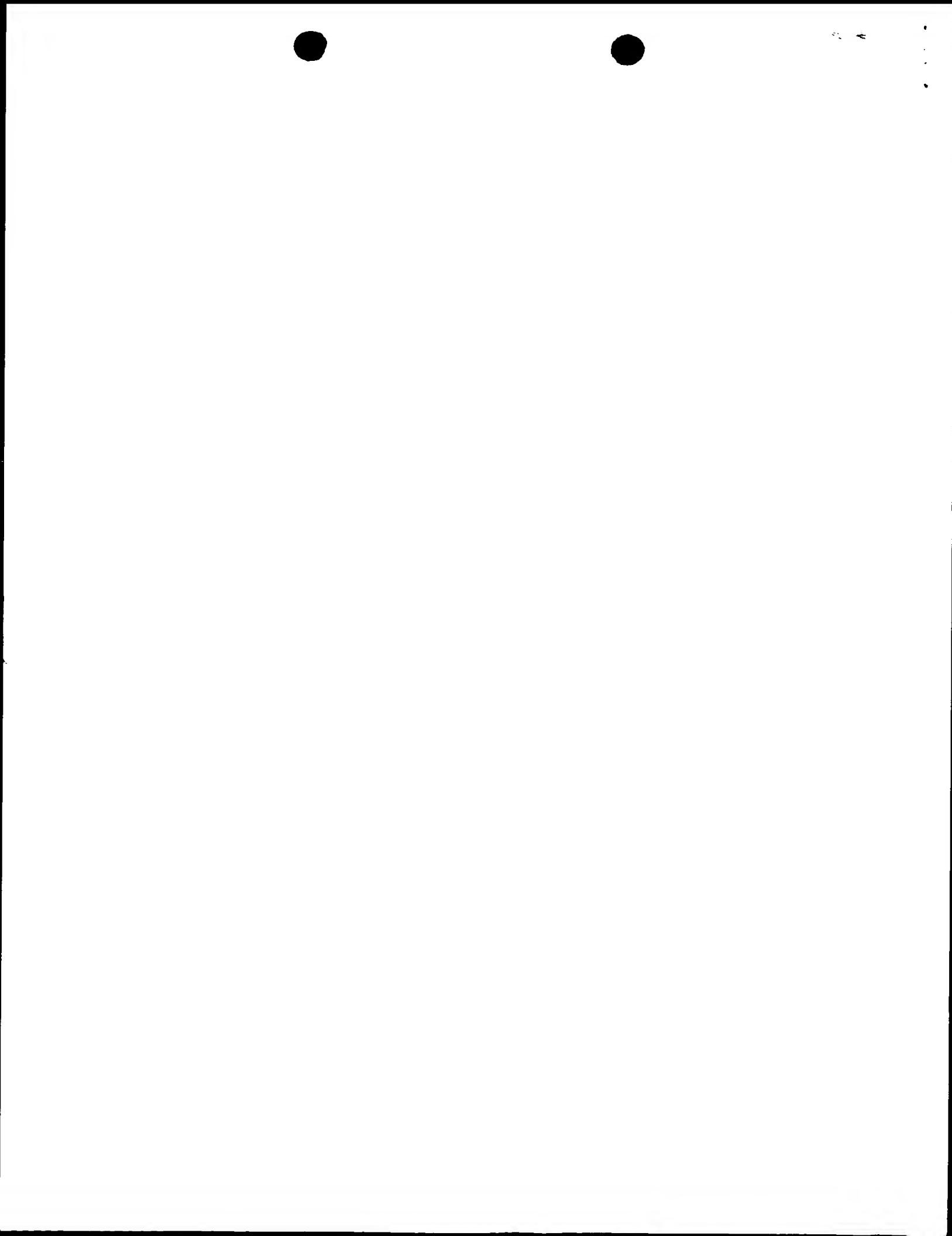
10

PCT/DE98/03155

K 2607 - hu/msl

**Patentansprüche**

- 5        1. Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, wobei das Protein zumindest eine der in Fig. 1 angegebenen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II umfaßt und durch die DNA von Fig. 2.1, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6 oder 2.7 bzw. durch eine mit dieser DNA über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA, kodiert wird.
- 10      2. DNA, kodierend für das Protein nach Anspruch 1, wobei die DNA jene von Fig. 2.1, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6 oder 2.7 bzw. eine mit dieser DNA über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA ist.
- 15      3. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 2.
4. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 3.
- 20      5. Verfahren zur Herstellung des Proteins nach Anspruch 1, umfassend die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 4 unter geeigneten Bedingungen.
6. Antikörper, gerichtet gegen das Protein nach Anspruch 5.
- 25      7. Verwendung eines Proteins, das zumindest eine der in Fig. 1 angegebenen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II umfaßt, bzw. eine für ein solches Protein kodierende DNA zum diagnostischen und/oder therapeutischen Eingreifen in den wnt-Signalweg.



*Se*

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

**PCT**

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>K 2607 - hu/ms1</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/DE 98/ 03155</b>	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) <b>27/10/1998</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>27/10/1997</b>
Anmelder <b>DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG ...et al.</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt **4** Blätter.

Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

**1. Grundlage des Berichts**

- a. Hinsichtlich der Sprache ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.
- Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.
- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
- in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2.  Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3.  Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

- wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

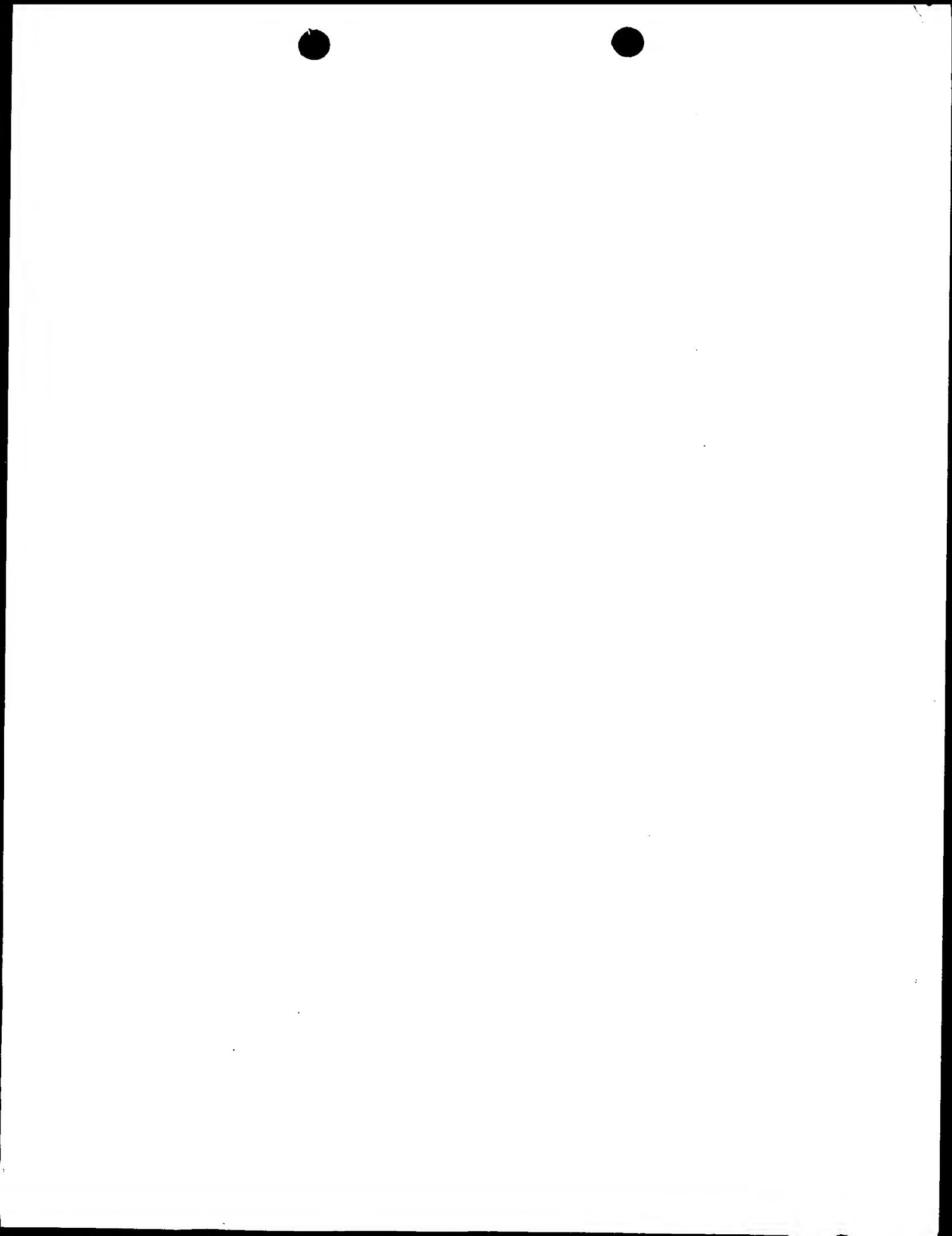
5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

- wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. \_\_\_\_\_

- wie vom Anmelder vorgeschlagen
- weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
- weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

keine der Abb.



**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/ 03155

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
**Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 9,10, insoweit bezogen auf ein in Vivo Verfahren sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.**
2.  Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3.  Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

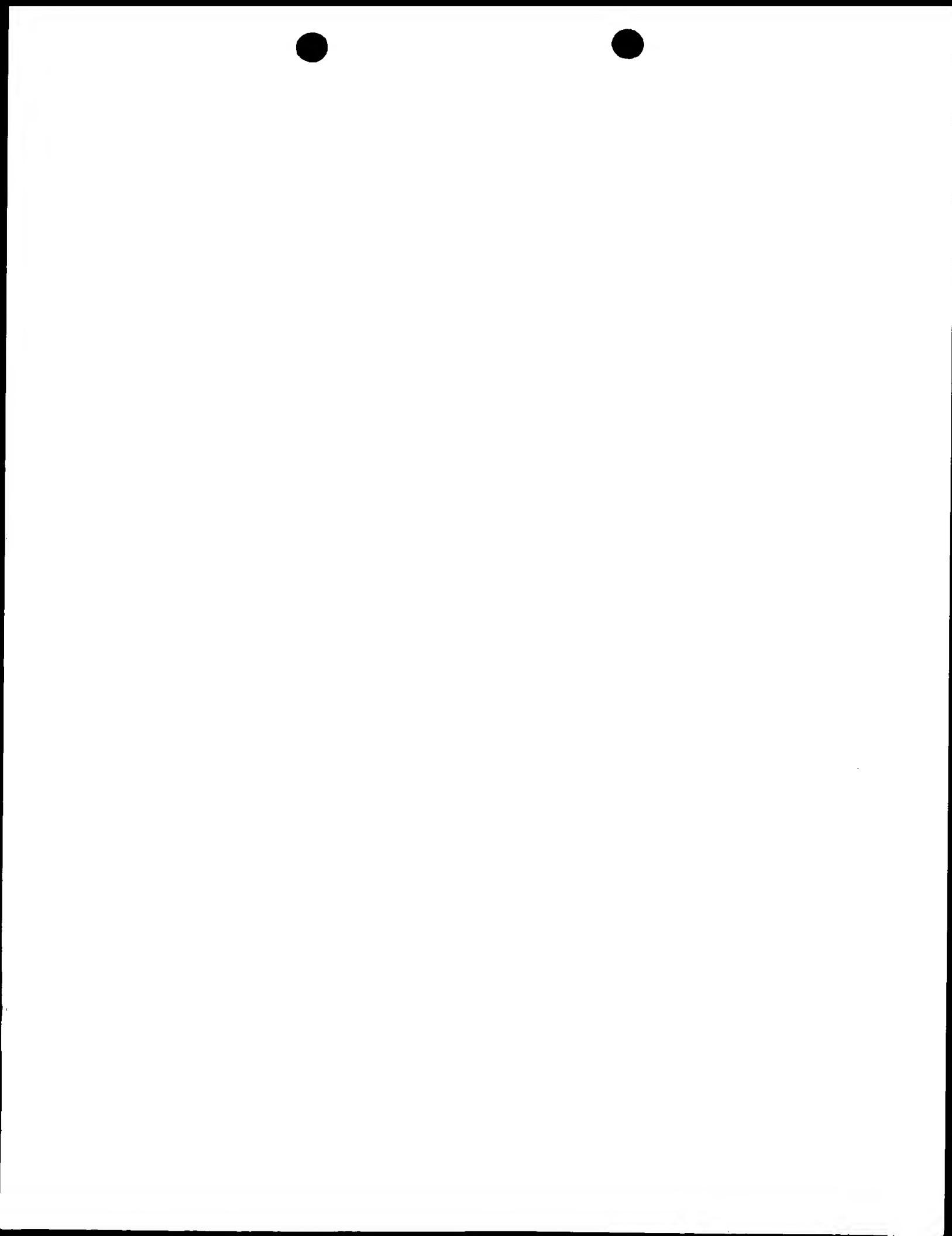
Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/DE 98/03155

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  

Remark: Although claims 9, 10 relate to a method for treating the human/animal body insofar as they relate to an in vivo method, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

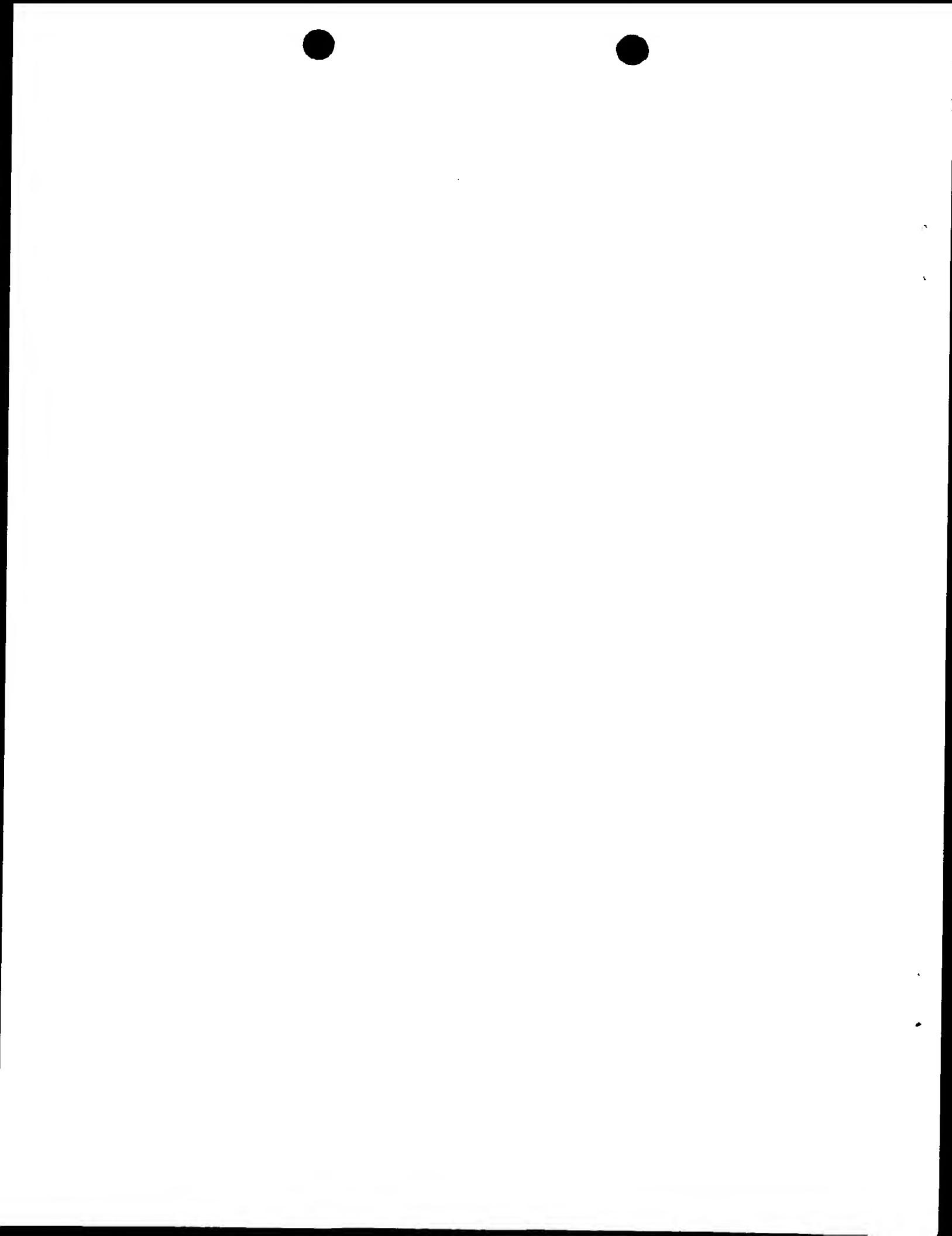
**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/03155

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES									
IPK 6	C12N15/18	C07K14/475	C07K16/22	C12N5/10	A61K38/22				
	A61K48/00	G01N33/53	C12Q1/68						

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>a</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SAWADA K ET AL: "Characterization of terminally differentiated cell state by categorizing cDNA clones derived from chicken lens fibers." INT J DEV BIOL, JUN 1996, 40 (3) P531-5, XP002096086 SPAIN siehe das ganze Dokument -& EMVRT DATABASE Accession number D26311 29-JUL-1994 (Rel. 40, Created) Sawada K XP002096089 siehe das ganze Dokument ---	3,4
X	-/-	3,4

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- <sup>b</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "\*&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

10. März 1999

23/03/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gurdjian, D

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen  
PCT/DE 98/03155

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie <sup>3</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beir. Anspruch Nr.
A	GLINKA A ET AL: "Head induction by simultaneous repression of Bmp and Wnt signalling in Xenopus." NATURE, OCT 2 1997, 389 (6650) P517-9, XP002096087 ENGLAND siehe das ganze Dokument -----	1-10
P, X	GLINKA, ANDREI ET AL: "Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction" NATURE (LONDON) (1998), 391(6665), 357-362 CODEN: NATUAS; ISSN: 0028-0836, XP002096088 siehe das ganze Dokument -----	1-10

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/03155

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
**Bemerkung:** Obwohl die Ansprüche 9,10, insoweit bezogen auf ein in Vivo Verfahren sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2.  Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3.  Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

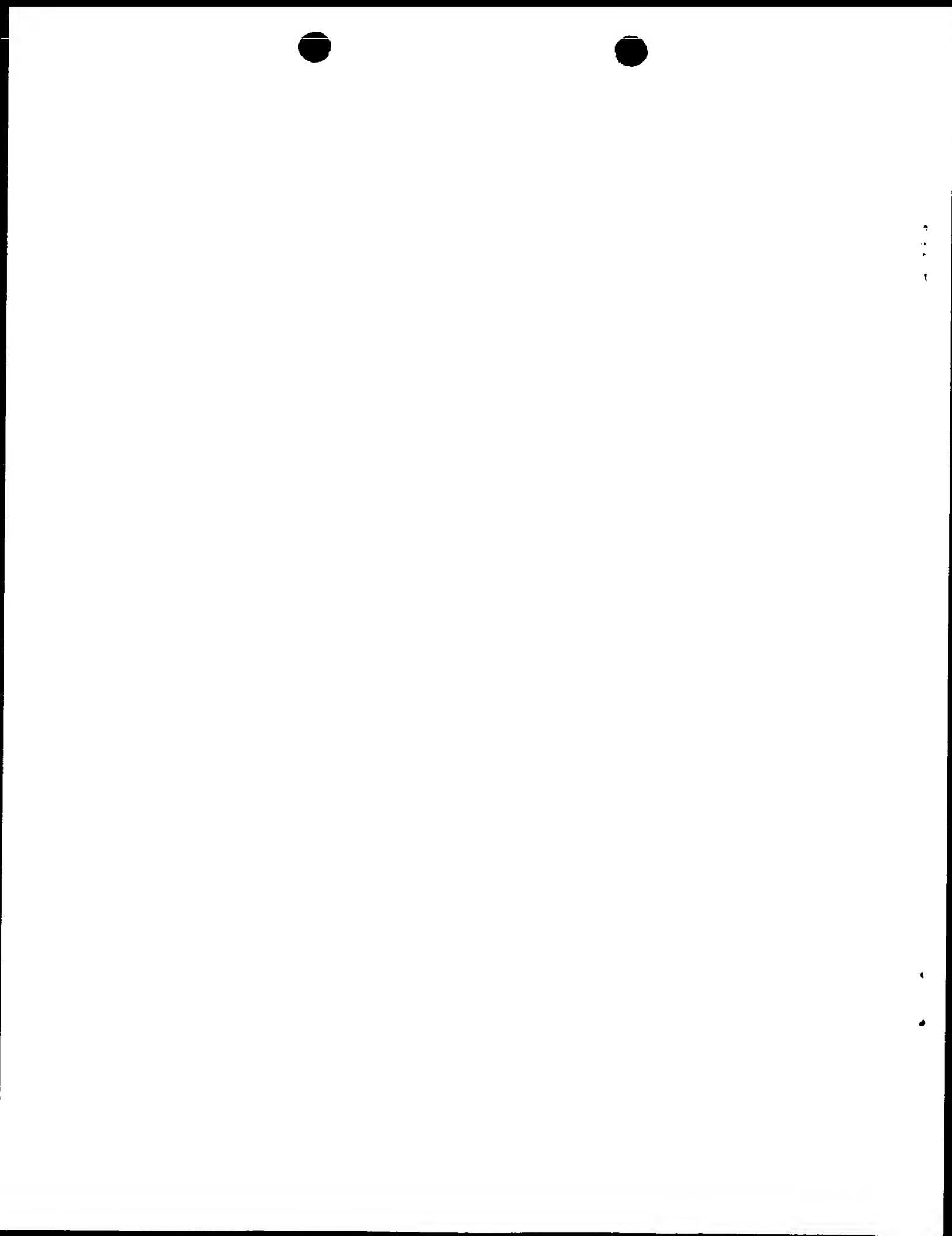
## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

### Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

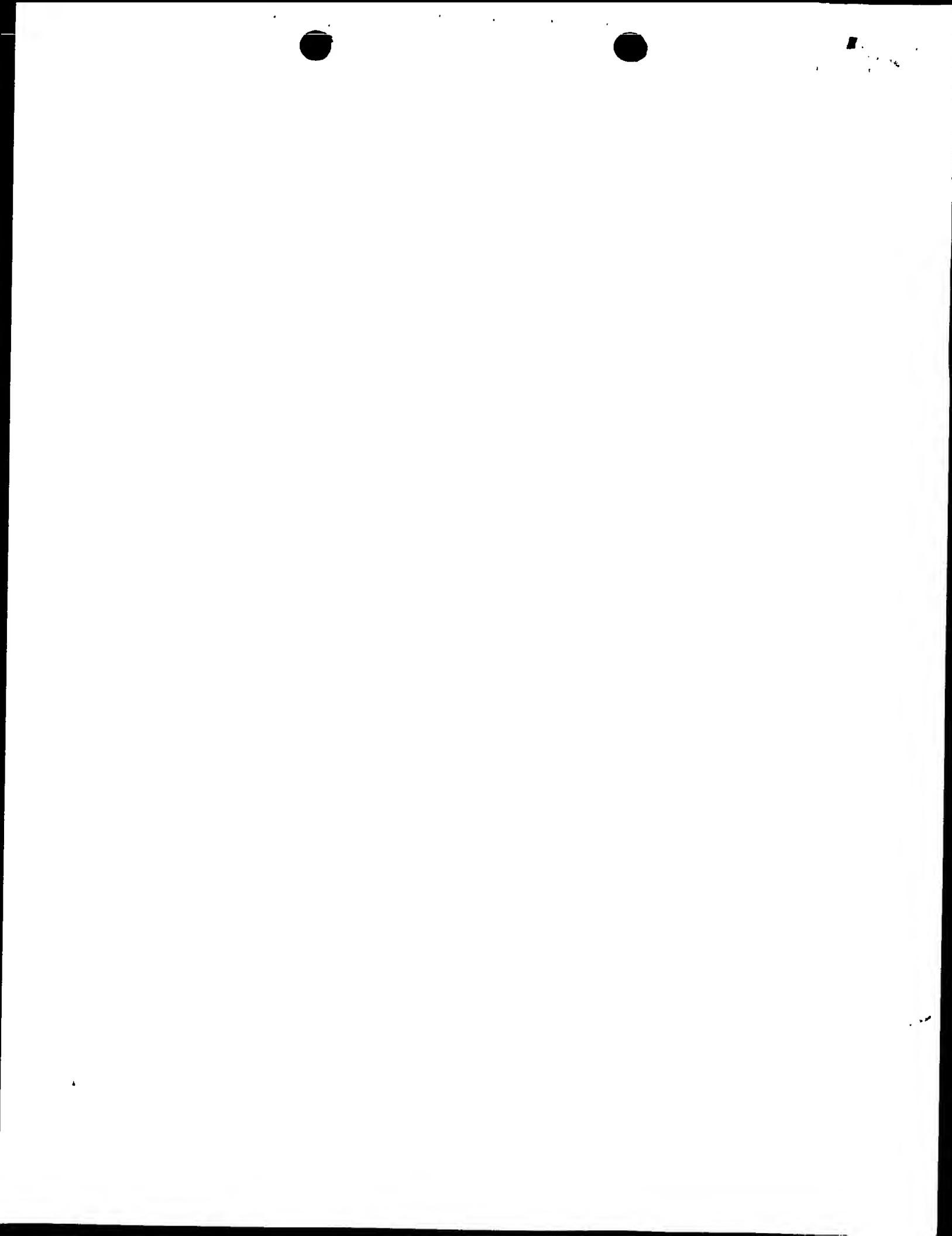
- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.



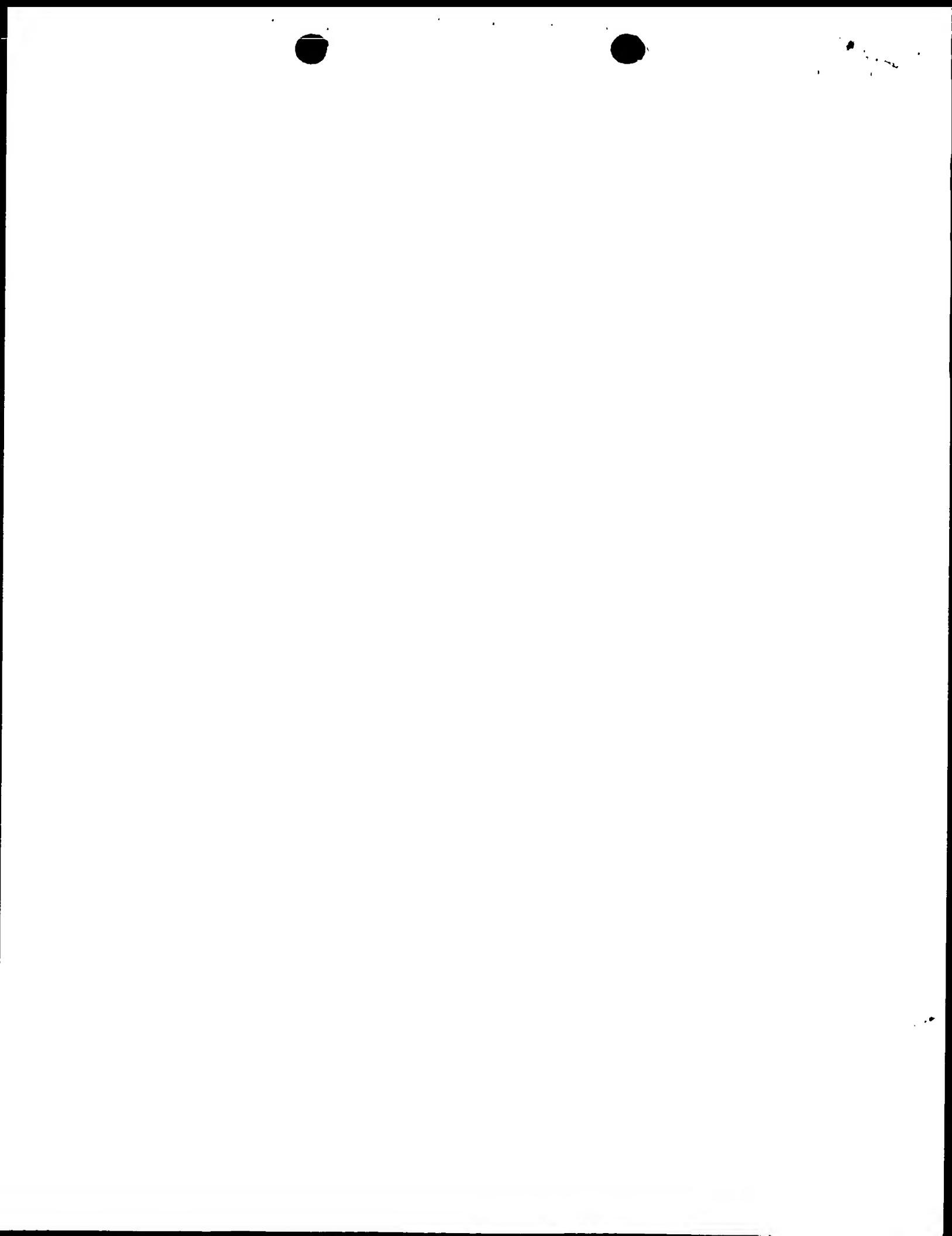
**REPLACED BY  
ART 34 AMDT**

**Claims**

1. An inhibitor protein of the wnt signal path, wherein the protein comprises at least one of the amino acid consensus sequences I and II indicated in fig. 1.
2. The protein according to claim 1, wherein the protein comprises the amino acid consensus sequences I and II.
3. A DNA coding for the protein according to claim 1 or 2.
4. The DNA according to claim 3, wherein the DNA comprises:  
  
the DNA of fig. 2 or a DNA differing therefrom by one or several base pairs,  
a DNA hybridizing with the DNA of (a) or  
a DNA related to the DNA of (a) or (b) via the degenerated genetic code.
5. An expression plasmid, comprising the DNA according to claim 3 or 4.
6. A transformant, containing the expression plasmid according to claim 5.
7. A process for the preparation of the protein according to claim 1 or 2, comprising the culturing of the transformant according to claim 6 under suitable conditions.
8. Antibodies directed against the protein according to claim 1 or 2.



9. Use of the protein according to claim 1 or 2 as a reagent for diagnosis and/or treatment.
10. Use of the DNA according to claim 3 or 4 as a reagent for diagnosis and/or treatment.



PCT

**ANTRAG**

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmeldedatum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)  
(max. 12 Zeichen) K 2607 - hu/ms1

**Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG**

Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs

**Feld Nr. II ANMELDER**

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Deutsches Krebsforschungszentrum  
Stiftung des öffentlichen Rechts  
Im Neuenheimer Feld 280  
D-69120 Heidelberg

Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

alle Bestimmungsstaaten

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

**Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER**

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

NIEHRS, Christof  
Klingenteichstr. 6b  
D-69117 Heidelberg

Diese Person ist:

nur Anmelder

Anmelder und Erfinder

nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

alle Bestimmungsstaaten

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsbogen angegeben.

**Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT**

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als:  Anwalt  gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Dr. Bernard Huber  
Truderinger Str. 246  
81825 München

Telefonnr.:

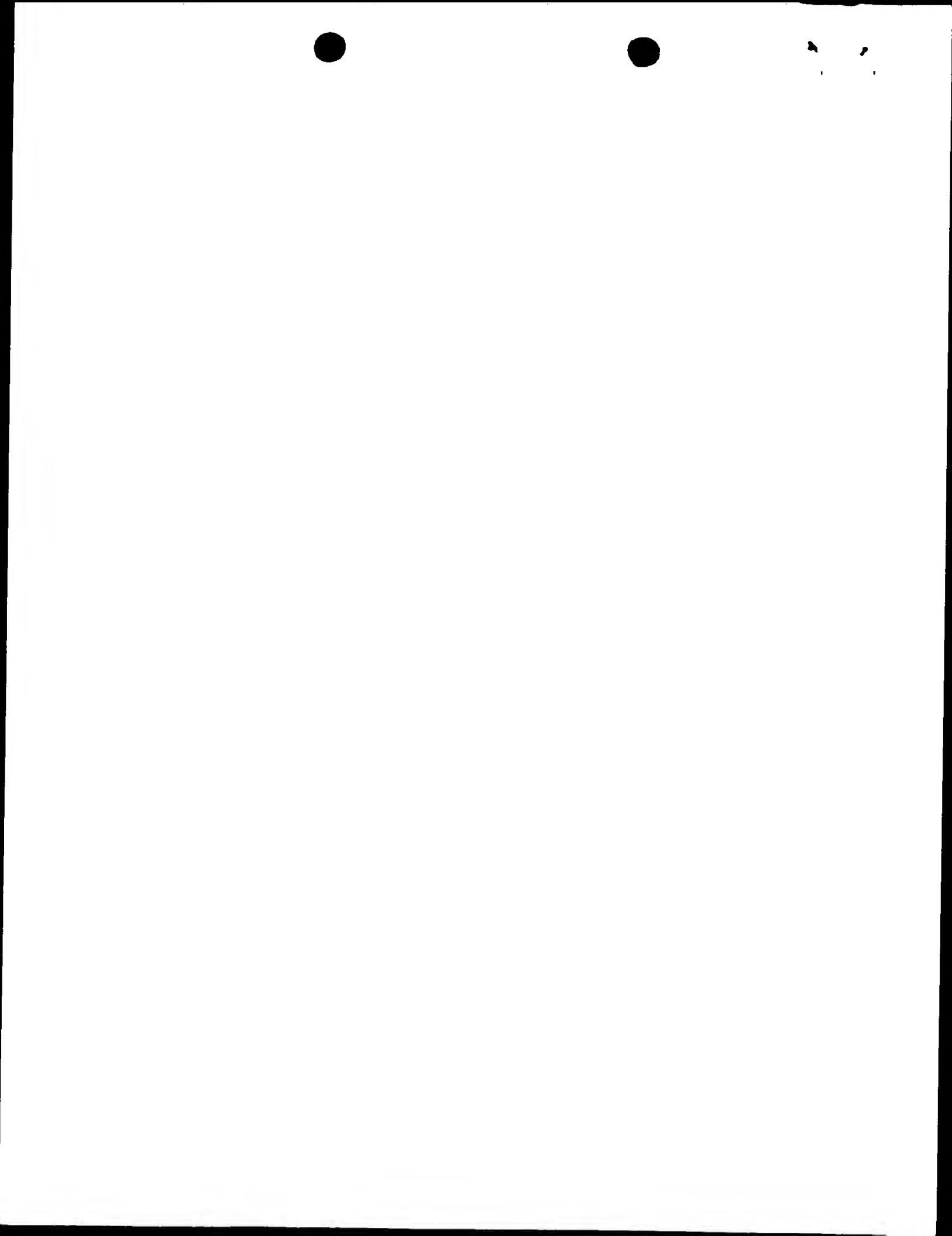
089/42724748

Telefaxnr.:

089/42724749

Fernschreibnr.:

Zustellanschrift: Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.



## Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigefügt werden.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

GLINKA, Andrei  
Erlenweg 22  
D-69126 Heidelberg

Diese Person ist:

- nur Anmelder  
 Anmelder und Erfinder  
 nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

RU

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:  alle Bestimmungsstaaten  alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika  nur die Vereinigten Staaten von Amerika  die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

- nur Anmelder  
 Anmelder und Erfinder  
 nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:  alle Bestimmungsstaaten  alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika  nur die Vereinigten Staaten von Amerika  die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

- nur Anmelder  
 Anmelder und Erfinder  
 nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:  alle Bestimmungsstaaten  alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika  nur die Vereinigten Staaten von Amerika  die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

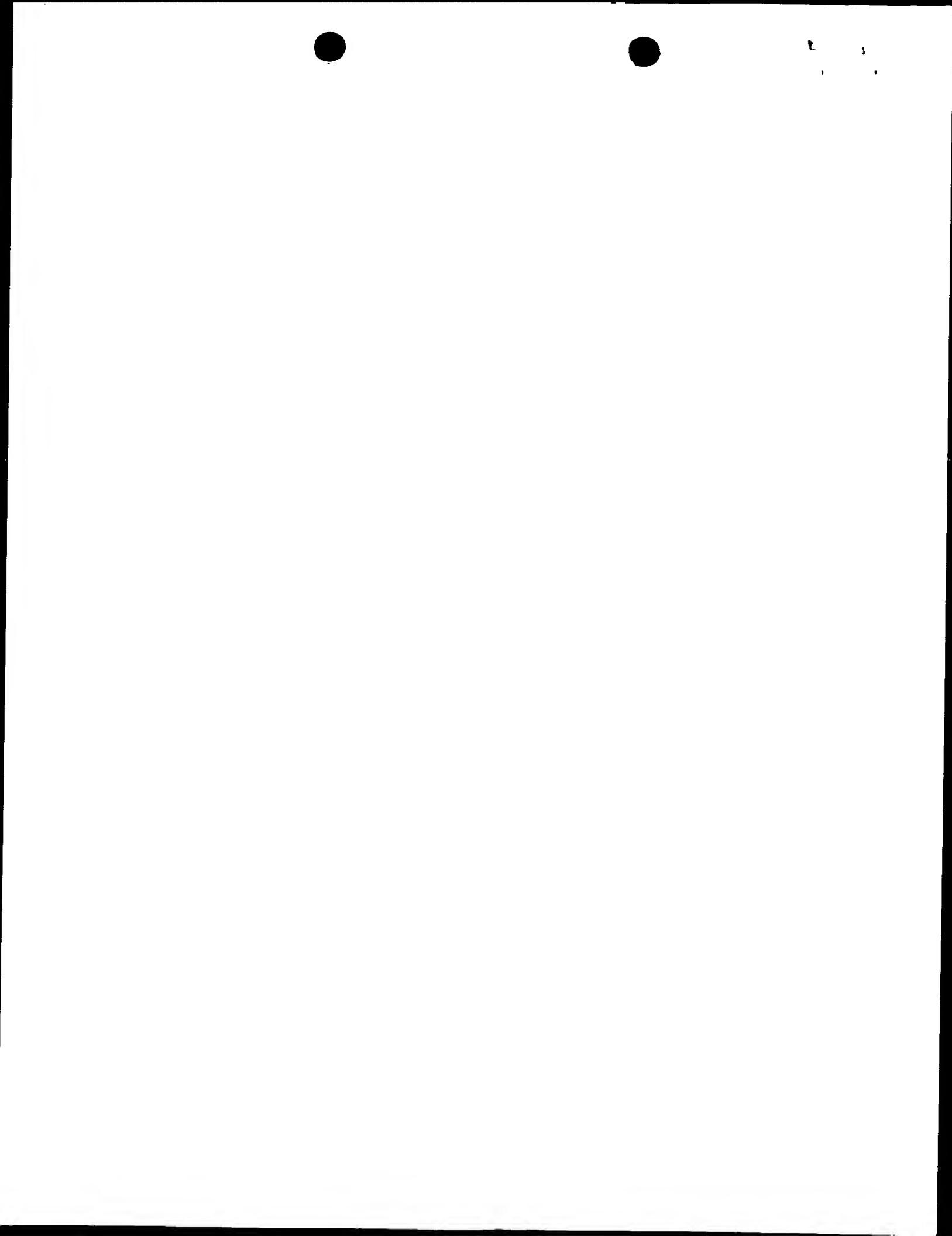
- nur Anmelder  
 Anmelder und Erfinder  
 nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:  alle Bestimmungsstaaten  alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika  nur die Vereinigten Staaten von Amerika  die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.



**Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN**

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

**Regionales Patent**

- AP ARIPO-Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- EA Eurasisches Patent: AM Armenien, AZ Aserbaidschan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- EP Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- OA OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guine, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

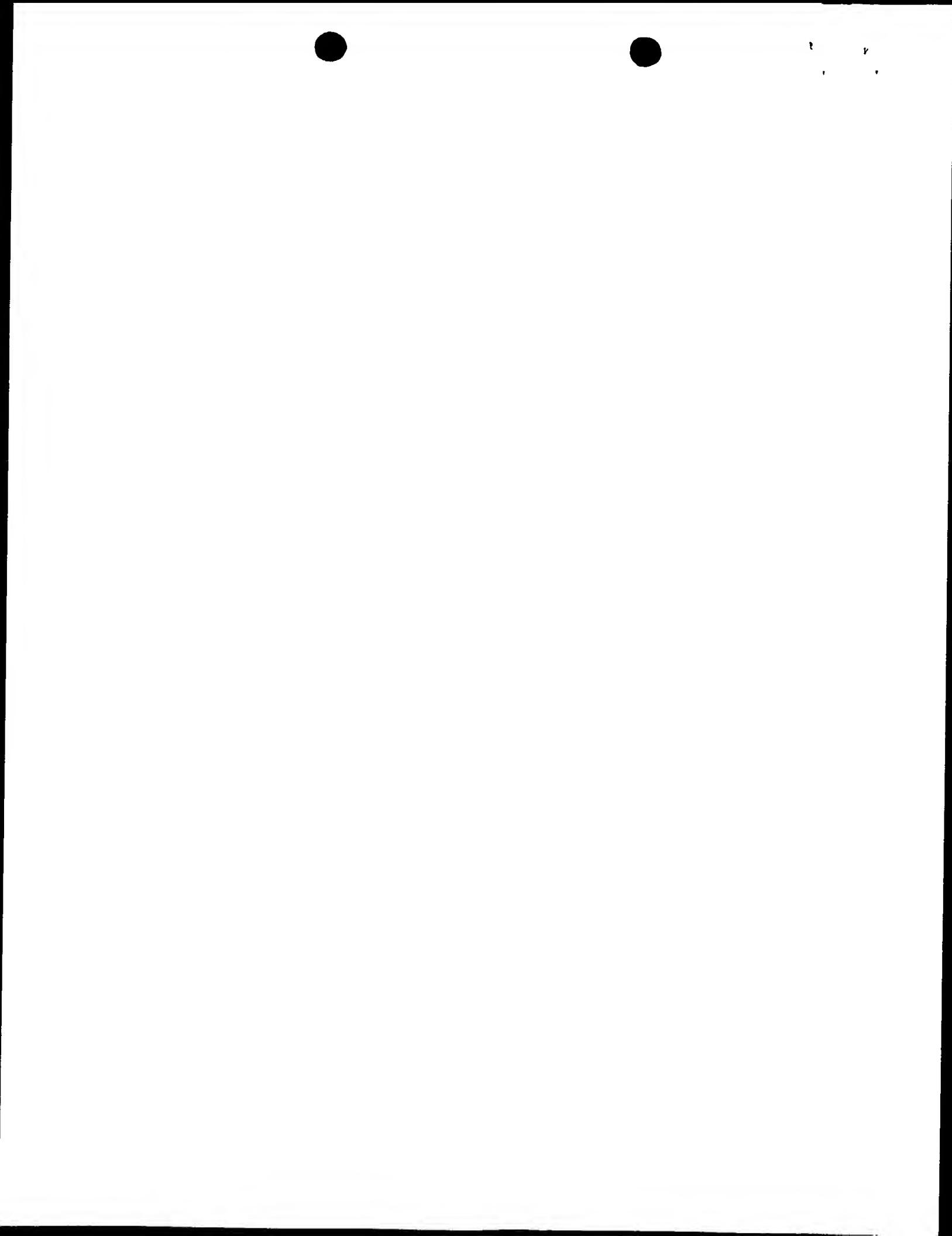
Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- |   |   |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AL Albanien .....                          | <input type="checkbox"/> LS Lesotho .....   |
| <input type="checkbox"/> AM Armenien .....                          | <input type="checkbox"/> LT Litauen .....   |
| <input type="checkbox"/> AT Österreich .....                        | <input type="checkbox"/> LU Luxemburg .....                                       |
| <input type="checkbox"/> AU Australien .....                        | <input type="checkbox"/> LV Lettland .....  |
| <input type="checkbox"/> AZ Aserbaidschan .....                     | <input type="checkbox"/> MD Republik Moldau .....                                 |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina .....               | <input type="checkbox"/> MG Madagaskar .....                                      |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados .....                          | <input type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien ..... |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarien .....                         | <input type="checkbox"/> MN Mongolei .....  |
| <input type="checkbox"/> BR Brasilien .....                         | <input type="checkbox"/> MW Malawi .....  |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus .....                           | <input type="checkbox"/> MX Mexiko .....  |
| <input type="checkbox"/> CA Kanada .....                            | <input type="checkbox"/> NO Norwegen .....  |
| <input type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein .....  | <input type="checkbox"/> NZ Neuseeland .....                                      |
| <input type="checkbox"/> CN China .....                             | <input type="checkbox"/> PL Polen .....   |
| <input type="checkbox"/> CU Kuba .....                              | <input type="checkbox"/> PT Portugal .....  |
| <input type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik .....             | <input type="checkbox"/> RO Rumänien .....  |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland .....                       | <input type="checkbox"/> RU Russische Föderation .....                            |
| <input type="checkbox"/> DK Dänemark .....                          | <input type="checkbox"/> SD Sudan .....   |
| <input type="checkbox"/> EE Estland .....                           | <input type="checkbox"/> SE Schweden .....  |
| <input type="checkbox"/> ES Spanien .....                           | <input type="checkbox"/> SG Singapur .....  |
| <input type="checkbox"/> FI Finnland .....                          | <input type="checkbox"/> SI Slowenien .....                                       |
| <input type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich .....            | <input type="checkbox"/> SK Slowakei .....  |
| <input type="checkbox"/> GE Georgien .....                          | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone .....                                    |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana .....                             | <input type="checkbox"/> TJ Tadschikistan .....                                   |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia .....                            | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan .....                                    |
| <input type="checkbox"/> GW Guinea-Bissau .....                     | <input type="checkbox"/> TR Türkei .....  |
| <input type="checkbox"/> HR Kroatien .....                          | <input type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago .....                             |
| <input type="checkbox"/> HU Ungarn .....                            | <input type="checkbox"/> UA Ukraine .....   |
| <input type="checkbox"/> ID Indonesien .....                        | <input type="checkbox"/> UG Uganda .....  |
| <input type="checkbox"/> IL Israel .....                            | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika .....       |
| <input type="checkbox"/> IS Island .....                            | <input type="checkbox"/> UZ Usbekistan .....                                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan .....                  | <input type="checkbox"/> VN Vietnam .....   |
| <input type="checkbox"/> KE Kenia .....                             | <input type="checkbox"/> YU Jugoslawien .....                                     |
| <input type="checkbox"/> KG Kirgisistan .....                       | <input type="checkbox"/> ZW Simbabwe .....  |
| <input type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea ..... |   |
| <input type="checkbox"/> KR Republik Korea .....                    |   |
| <input type="checkbox"/> KZ Kasachstan .....                        |   |
| <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia .....                       |   |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka .....                         |   |
| <input type="checkbox"/> LR Liberia .....                           |   |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:

- .....
- .....

**Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen:** Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)



**Feld Nr. VI PRIORITYANSPRUCH** Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben.

Anmeldedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen der früheren Anmeldung	Ist die frühere Anmeldung eine:		
		nationale Anmeldung: Staat	regionale Anmeldung: regionales Amt	internationale Anmeldung: Anmeldeamt
Zeile (1) Deutschland	27. Oktober 1997 (27.10.97)	197 47 418.7		
Zeile (2)				
Zeile (3)				

Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in der (den) Zeile(n) 1 bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist(sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist).  
 \* Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, so muß in dem Zusatzfeld mindestens ein Staat angegeben werden, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung eingereicht wurde.

**Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE**

Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA) (falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden)	Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche; Bezugnahme auf diese frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist): Datum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen	Staat (oder regionales Amt)
ISA / EPA			

**Feld Nr. VIII KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE**

Diese internationale Anmeldung enthält die folgende Anzahl von Blättern:	Dieser internationale Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:
Antrag : 4	1. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung
Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil) : 14	2. <input type="checkbox"/> Gesonderte unterzeichnete Vollmacht
Ansprüche : 2	3. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden):
Zusammenfassung : 1	4. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen einer Unterschrift
Zeichnungen : 11	5. <input type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer gekennzeichnet:
Sequenzprotokollteil der Beschreibung : 7	6. <input type="checkbox"/> Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache:
Blattzahl insgesamt : 39	7. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material
	8. <input checked="" type="checkbox"/> Protokoll der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzen in computerlesbarer Form
	9. <input checked="" type="checkbox"/> Sonstige (einzelnen aufführen): Scheck, Kopie f. Priobeleg

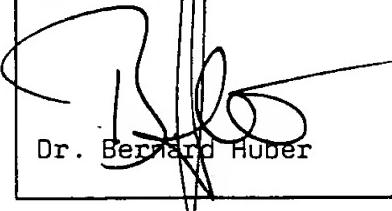
Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.):

Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird:

**Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS**

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

München, 27. Oktober 1998



Dr. Bernhard Huber

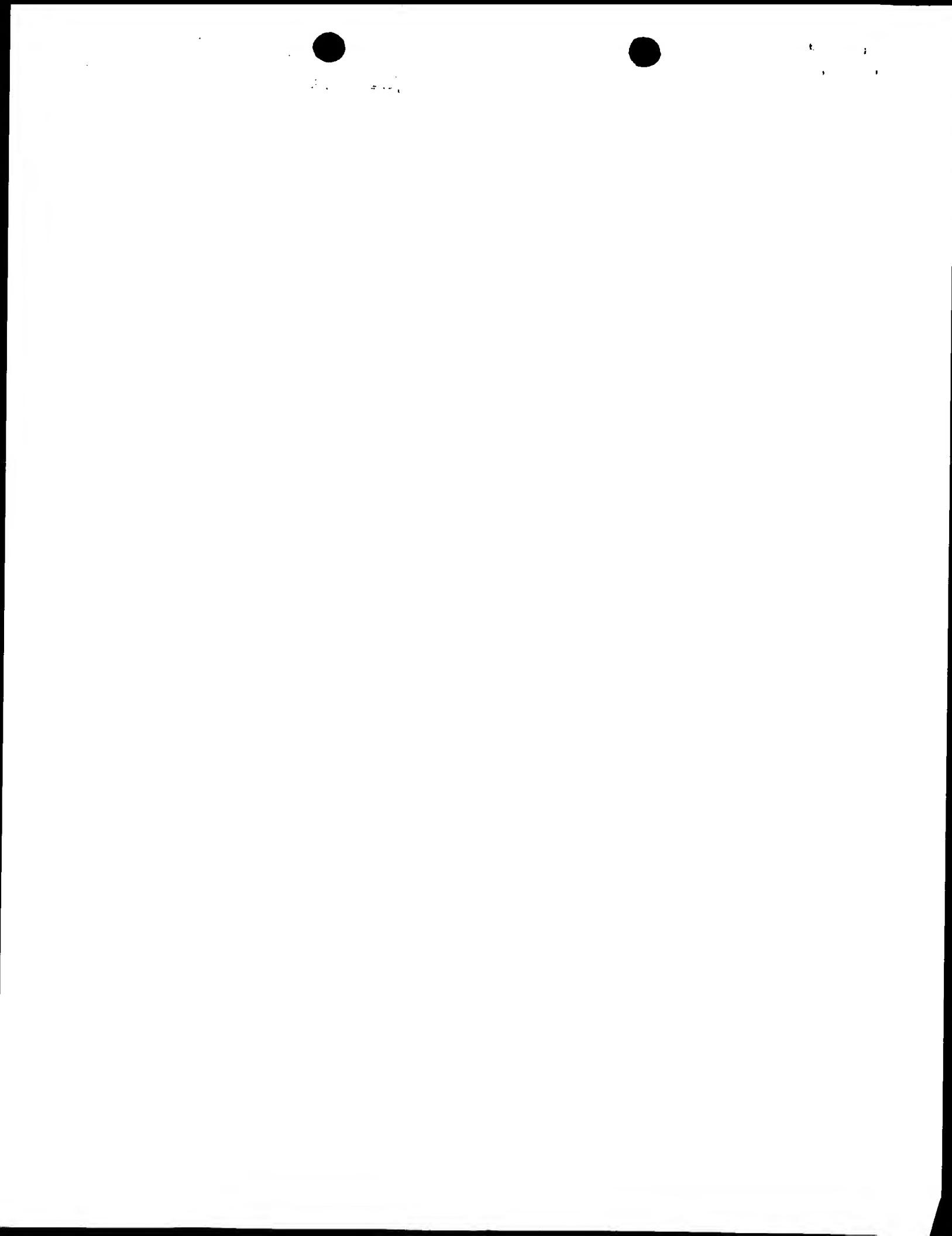
Vom Anmeldeamt auszufüllen

1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationale Anmeldung:	2. Zeichnungen einge-gangen: <input type="checkbox"/>
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	4. nicht einge-gangen: <input type="checkbox"/>
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	
5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind): ISA /	6. Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchengebühr aufgeschoben <input type="checkbox"/>

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

Siehe Anmerkungen zu diesem Antragsformular



**Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, eine ein solches Protein kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Proteins. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.

5

Der wnt-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellproliferation und -Differenzierung während der Embryonal-Entwicklung von Drosophila, Xenopus laevis und der Maus. Der wnt-Signalweg umfaßt die Kombination von sekretorischen Glykoproteinen, die durch wnt-Gene, z.B. Xwnt-8, kodiert sind, und wnt-Rezeptoren, an die die Glykoproteine binden. Ferner ist der wnt-Signalweg beim Menschen kausal im Colon- und Mammakarzinom sowie dem Melanom impliziert (vgl. Peifer, M., Science 275, (1997), 1752-1753). Inhibitoren des wnt-Signalwegs könnten daher eine Möglichkeit darstellen, therapeutisch bei Tumorerkrankungen eingreifen zu können.

15

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem der wnt-Signalweg inhibiert werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen

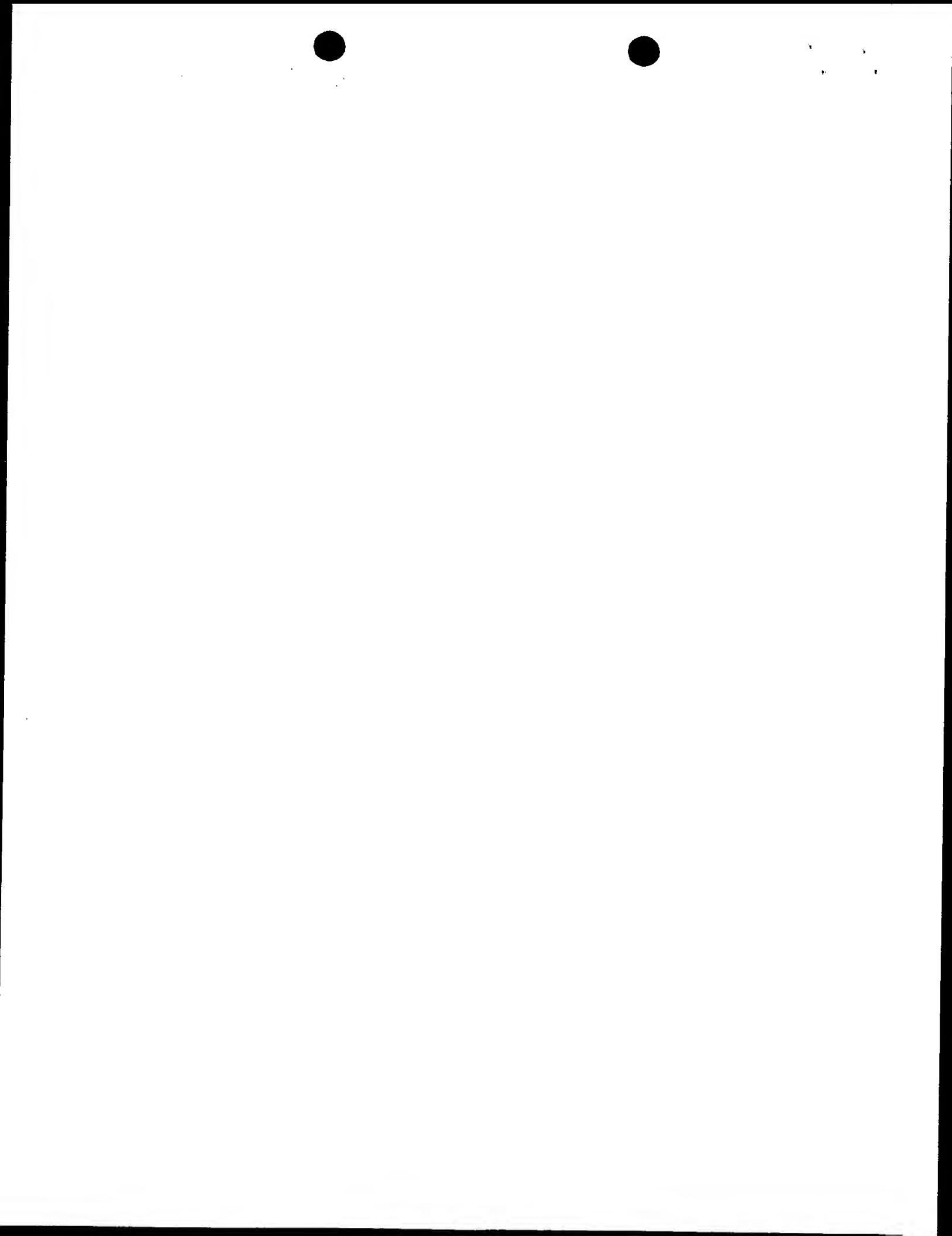
20

erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, wobei das Protein zumindest eine der in Fig. 1 angegebenen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II umfaßt.

25

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis des Anmelders, daß in Tieren, besonders Säugetieren, ganz besonders dem Menschen, ein Protein existiert, das den wnt-Signalweg inhibiert. Der Anmelder hat gefunden, daß die



- 2 -

Expression des wnt-Gens, Xwnt-8, in Xenopus laevis zur Ausbildung von Siamesischen Zwillingen führt. Diese Mißbildung wird verhindert, wenn gleichzeitig das vorstehende Protein exprimiert wird. Dieses Protein ist ein sekretorisches Protein von etwa 40 kD. Es weist zumindest eine der in Fig. 1 angegebenen Cysteinreichen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II auf. Varianten des Proteins sind in Form ihrer DNAs in Fig. 2 angegeben. Desweiteren hat der Anmelder erkannt, daß Varianten des Proteins in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden (vgl. Tabelle 1 und Fig. 3).

10 In der vorliegenden Erfindung wird vorstehendes Protein mit "wnt-Inhibitor" (wnt-I) bezeichnet.

In bevorzugter Ausführungsform weist (wnt-I) die in Fig. 1 angegebenen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II auf.

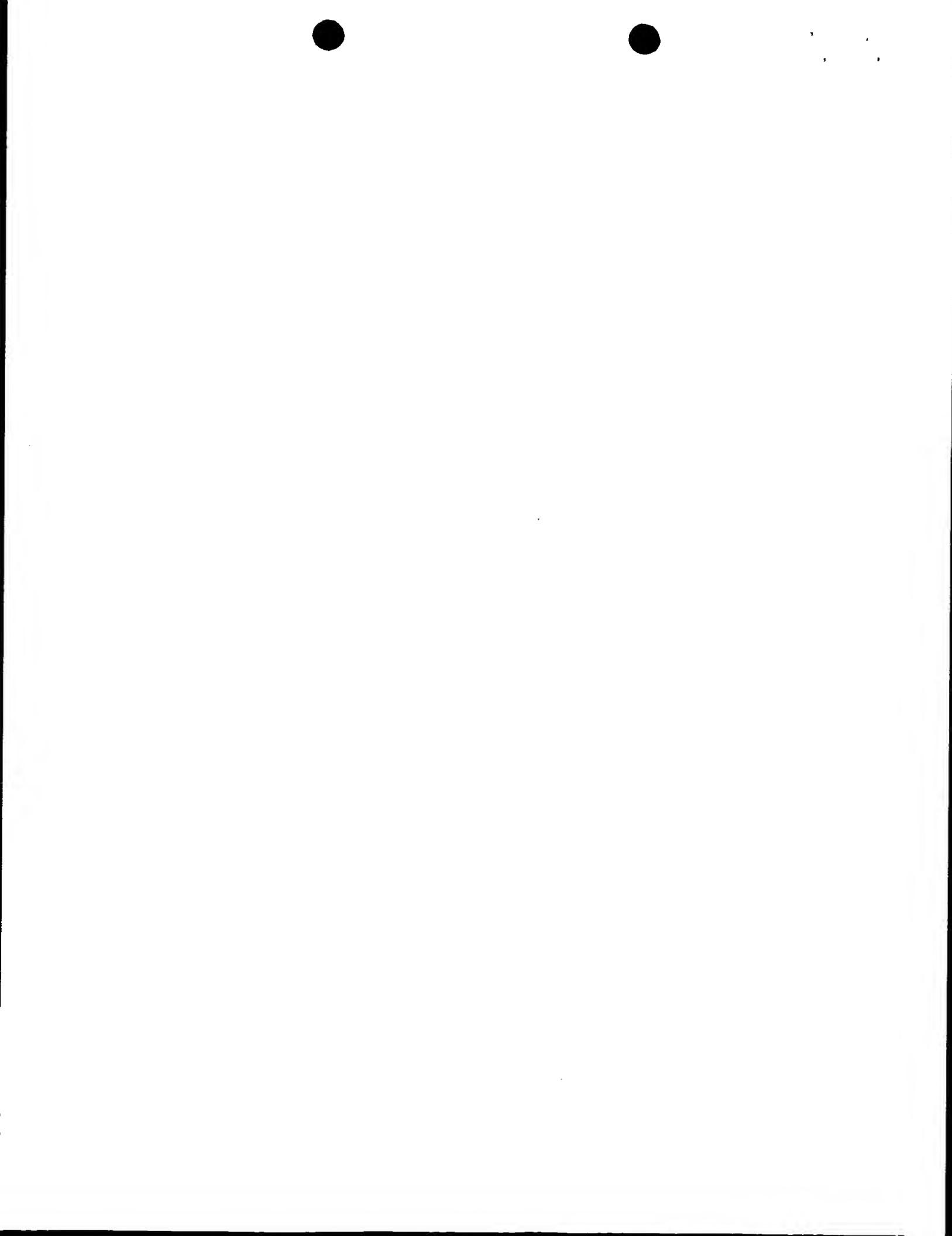
15 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine für (wnt-I) kodierende Nukleinsäure. Diese kann eine RNA oder eine DNA sein. Letztere kann z.B. eine genomische DNA oder eine cDNA sein. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

20 (a) die DNA von Fig. 2 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA,

(b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA, oder

25 (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

Der Ausdruck "hybridisierende DNA" weist auf eine DNA hin, die unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA, mit einer DNA von (a) hybridisiert.



Die DNA von Fig. 2 umfaßt sieben DNAs, die aus Xenopus laevis, Maus, Mensch oder Huhn stammen und für (wnt-I) kodieren. Sechs dieser DNAs wurden bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) am 19. Sept. 1997 wie folgt hinterlegt:

5

- Fig. 2.1 (DNA aus Mensch) als phdkk-3 unter DSM 11762
- Fig. 2.2 (DNA aus Huhn) trägt die Bezeichnung pcdkk-3
- Fig. 2.3 (DNA aus Maus) als pmdkk-2 unter DSM 11759
- Fig. 2.4 (DNA aus Mensch) als phdkk-2 unter DSM 11761
- 10 Fig. 2.5 (DNA aus Maus) als pmdkk-1 unter DMS 11758
- Fig. 2.6 (DNA aus Mensch) als phdkk-1 unter DSM 11760
- Fig. 2.7 (DNA aus Xenopus laevis) als pRNdkk-1 unter DSM 11757

10

Nachstehend wird eine erfindungsgemäße DNA in Form einer cDNA beschrieben.  
15 Diese steht beispielhaft für jede unter die vorliegende Erfindung fallende DNA.

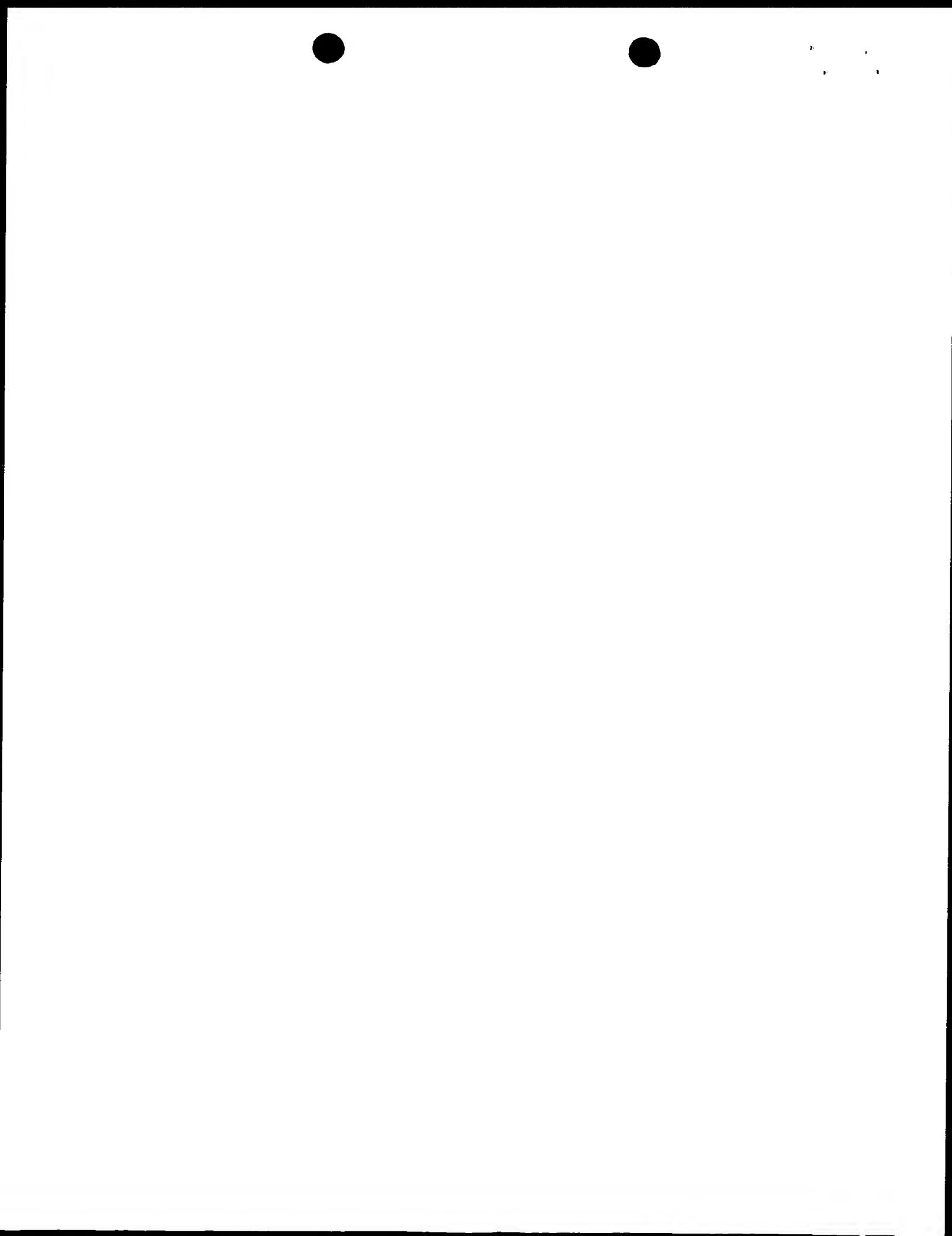
20

Zur Herstellung einer erfindungsgemäßen cDNA ist es günstig, von einer Xenopus laevis-cDNA-Bibliothek auszugehen (vgl. Glinka, A. et al., Mechanisms Develop 60, (1996), 221-231). Von den einzelnen cDNA-Klonen werden mittels RNA-Polymerase entsprechende mRNAs synthetisiert. Diese werden zusammen mit mRNA von wnt-Genen, z.B. Xwnt-8, in Xenopus laevis mikroinjiziert. Es wird auf die Ausbildung von Siamesischen Zwillingen bei Xenopus laevis gescreent. Diese werden erhalten, wenn die mRNA des wnt-Gens alleine oder zusammen mit solcher Xenopus laevis mRNA mikroinjiziert wird, die nicht für (wnt-I) kodiert. Das Nicht-Auftreten von Siamesischen Zwillingen wird somit als Nachweis für das Vorliegen einer mRNA gewertet, die für (wnt-I) kodiert. Solch eine mRNA läßt unmittelbar die entsprechende cDNA erkennen.

25

30

Eine erfindungsgemäße cDNA kann in einem Vektor bzw. Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für E. coli sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu



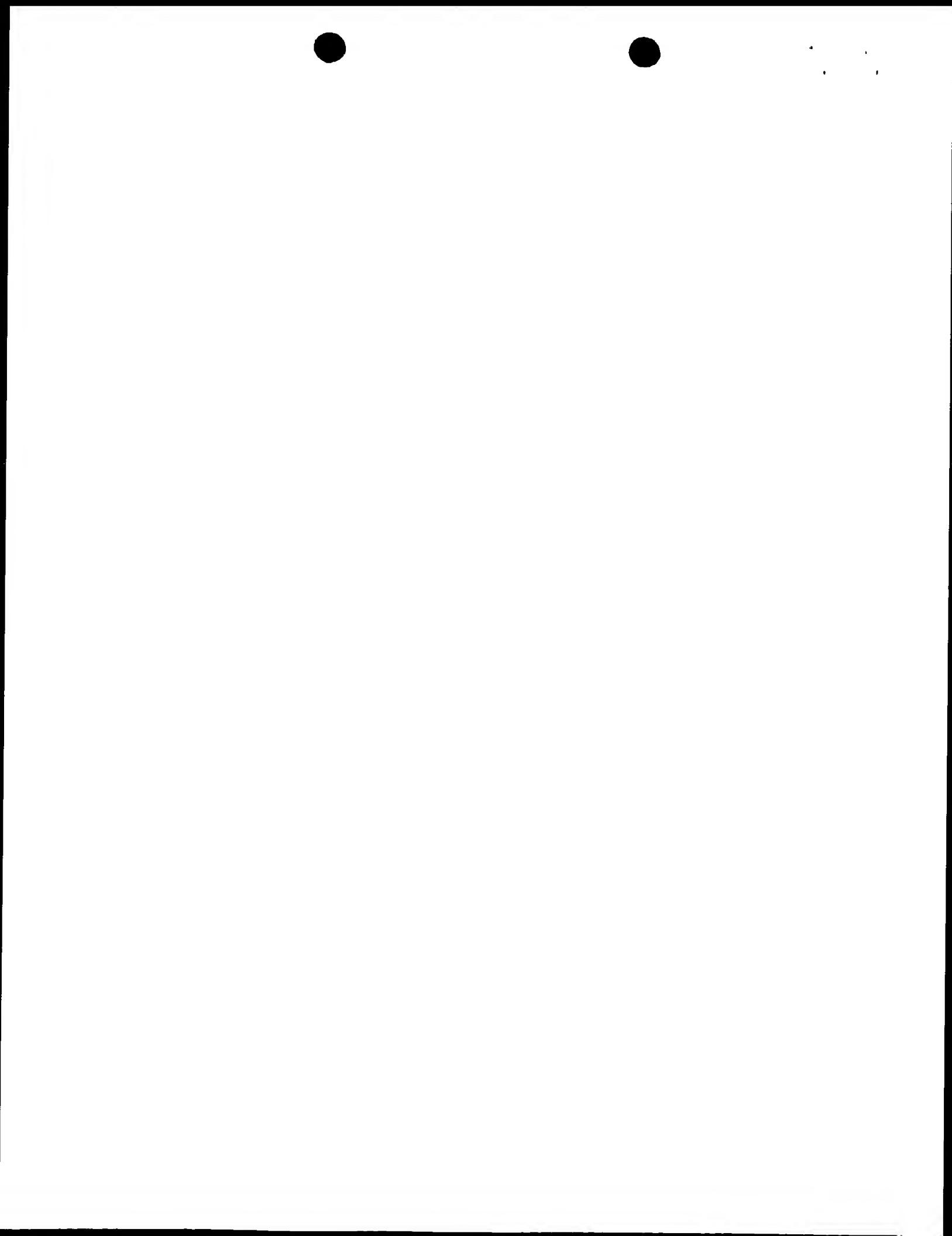
nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4, anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

5 Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um eine, erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende cDNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21 und SG 13009, den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae* und die tierischen Zellen L, 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und HeLa sowie die Insektenzellen sf9.

10 Der Fachmann weiß, in welcher Weise eine erfindungsgemäße cDNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese cDNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße cDNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann.

15 Des weiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. transfizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße cDNA exprimierte Protein zu isolieren und zu reinigen. Ein solches Protein, das auch ein Fusionsprotein sein kann, ist somit ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

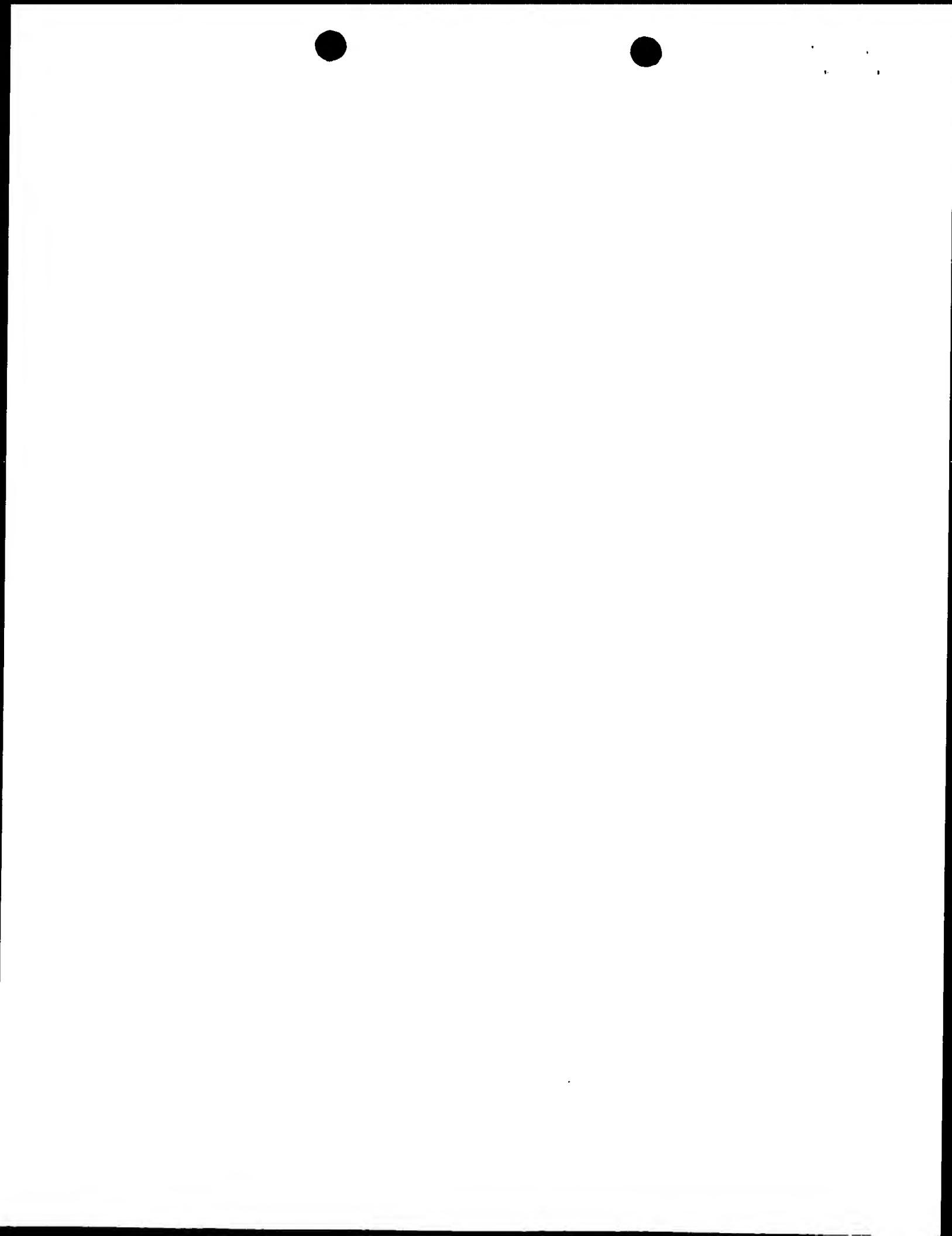
20 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Protein bzw. Fusionsprotein gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem vorstehenden (Fusions)protein oder Fragmenten davon zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fusions)protein oder Fragmenten davon erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.



Die vorliegende Erfindung ermöglicht es, den wnt-Signalweg besser zu untersuchen und zu verstehen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann (wnt-I) in Organismen nachgewiesen werden. Ferner kann mit einem erfindungsgemäßen (wnt-I) ein gegen dieses Protein gerichteter Autoantikörper nachgewiesen werden. Beide Nachweise können durch übliche Verfahren, insbesondere einen Western Blot, einen ELISA, eine Immunpräzipitation oder durch Immunfluoreszenz, erfolgen. Desweiteren kann mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA und hiervon abgeleiteten Primern, die Expression des für (wnt-I) kodierenden Gens nachgewiesen werden. Dieser Nachweis kann in üblicher Weise, insbesondere in einem Southern Blot, erfolgen.

Somit können mit der vorliegenden Erfindung auch Prozesse besser untersucht, d.h. diagnostiziert, und verstanden werden, die mit dem wnt-Signalweg zusammenhängen. Dies sind z.B. Zellproliferation und -Differenzierung sowie Erkrankungen verschiedenster Art. Beispiele von letzteren sind Erkrankungen des Auges und der Knochen sowie Tumorerkrankungen, insbesondere Colon- und Mammakarzinom sowie Melanom.

Desweiteren eignet sich die vorliegende Erfindung, Maßnahmen für und gegen das Vorliegen von (wnt-I) in Organismen zu ergreifen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann (wnt-I) in Organismen inhibiert werden. Andererseits kann mit einem erfindungsgemäßen (wnt-I), insbesondere nach Kopplung an ein vom Körper nicht als fremd angesehenes Protein, z.B. Transferrin oder BSA, die Menge von (wnt-I) in Organismen erhöht werden. Entsprechendes kann auch mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA, erreicht werden, die unter die Kontrolle eines in bestimmten Geweben induzierbaren Promotors gestellt wird und nach ihrer Expression zur Bereitstellung von (wnt-I) in diesen Geweben führt. Darüberhinaus kann eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, insbesondere eine DNA, auch zur Inhibierung von (wnt-I) genutzt werden. Hierzu wird die Nukleinsäure, z.B. als Basis für die Erstellung von Anti-Sinn-Oligonukleotiden zur Expressions-Inhibierung des für (wnt-I) kodierenden Gens verwendet.



Somit stellt die vorliegende Erfindung auch die Möglichkeit bereit, in den wnt-Signalweg aktivierend bzw. inhibierend einzugreifen. Erstes könnte z.B durch Verabreichung eines erfindungsgemäßen Antikörpers gegen (wnt-I) erfolgen. Für letzteres bietet sich an, erfindungsgemäßes (wnt-I) zu verabreichen. Die Aktivierung des wnt-Signalwegs könnte sinnvoll sein, wenn daran gedacht wird, Organismen für Organspende zu züchten. Die Inhibierung des wnt-Signalwegs bietet sich allerdings an, um therapeutisch bei Erkrankungen von Knochen und des Auges sowie bei Tumorerkrankungen, insbesondere Colon- und Mammakarzinomen sowie Melanom, eingreifen zu können.

10

Insbesondere zeichnet sich die vorliegende Erfindung dadurch aus, daß sie gewebespezifisch eingesetzt werden kann. Dies gilt sowohl für Diagnose als auch für Therapie. Beispielsweise eignet sich eine erfindungsgemäße DNA, DKK-1, ein entsprechendes Protein bzw. ein Antikörper davon besonders für Gewebe, wie Gehirn, Herz, Gefäße, Knochen, Knorpel, Bindegewebe und Auge. Ferner eignet sich eine erfindungsgemäße DNA, DKK-2, ein entsprechendes Protein bzw. ein Antikörper davon besonders für Gewebe, wie Gehirn, Herz, Gefäße, Knochen, Bindegewebe, Nieren, Hoden, Milz, Ovarien, Muskel, Uterus, Knorpel, Auge und Brustdrüse. Des Weiteren eignet sich eine erfindungsgemäße DNA, DKK-3, ein entsprechendes Protein bzw. ein Antikörper davon, besonders für Gewebe, wie Gehirn, Herz, Gefäße, Knochen, Knorpel, Auge, Bindegewebe, Lunge, Ovarien, Muskel und Brustdrüse.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

25

Fig. 1 zeigt die Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II eines erfindungsgemäßen (wnt-I). Die Angabe "-" bedeutet eine Aminosäure, wobei die Zahl der Aminosäuren variabel ist, wenn sie einen Stern aufweisen,

30

Fig. 2 zeigt die Basensequenz von sieben (wnt-I) kodierenden DNAs mit Angabe der Basen, die zu den Aminosäure-Konsensus-Sequenzen



von (wnt-I) beitragen.

Fig. 3 zeigt die Expression von drei (wnt-I) kodierenden DNAs, DKK-1, DKK-2 und DKK-3, in Geweben.

5

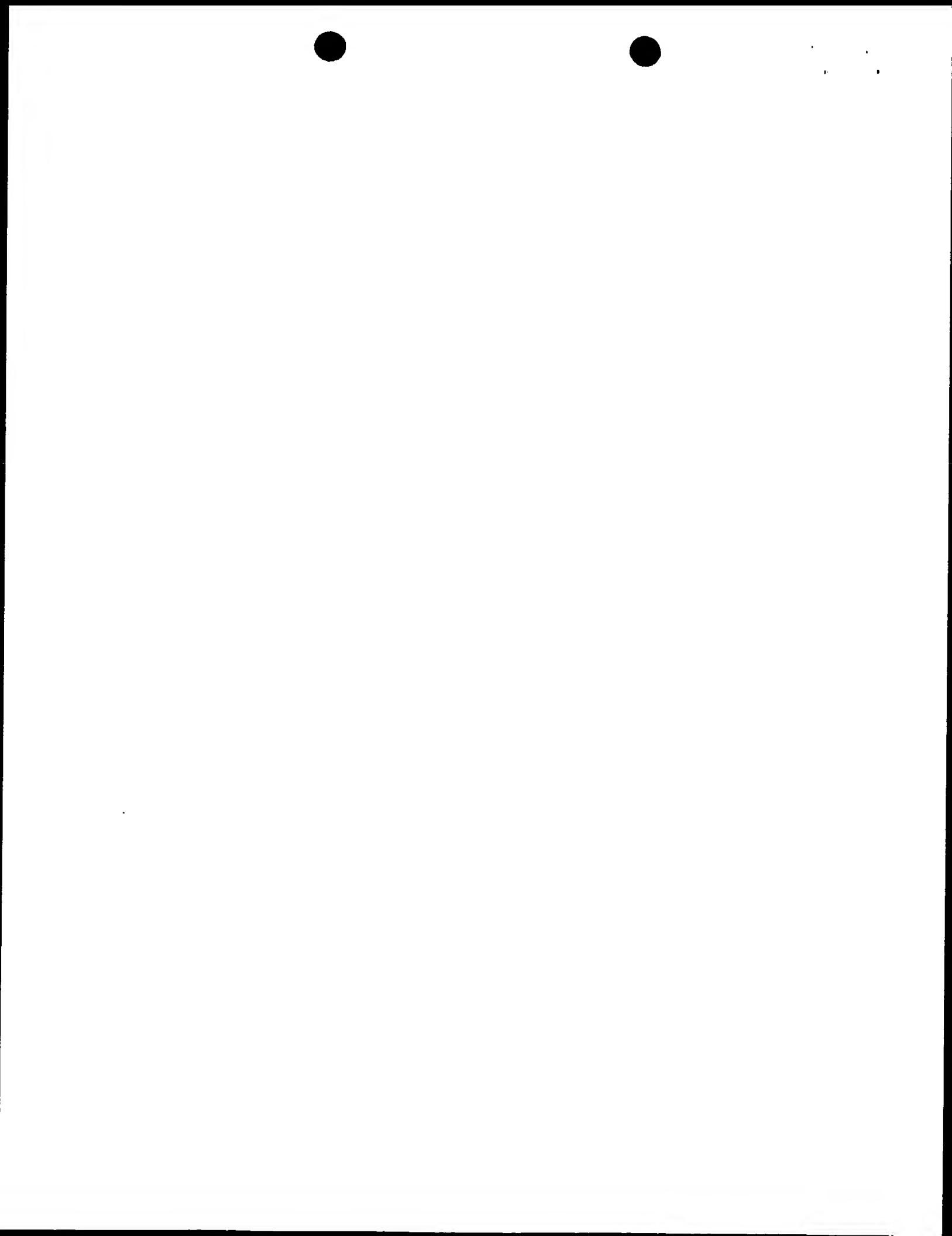
Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

**Beispiel 1: Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen (wnt-I)**

Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen (wnt-I) wurde die DNA von Fig. 2.6, phdkk-1 mit Bam HI-Linkern versehen, anschließend mit Bam HI gespalten und in den mit Bam HI gespaltenen Expressionsvektors pQE-8 (Qiagen) inseriert. Es wurde das Expressionsplasmid pQ/wnt-I erhalten. Ein solches kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner) und einem erfindungsgemäßen (wnt-I) (C-Terminuspartner). pQ/wnt-I wurde zur Transformation von E.coli SG 13009(vgl. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) verwendet. Die Bakterien wurden in einem LB-Medium mit 100 $\mu$ g/ml Ampicillin und 25 $\mu$ g/ml Kanamycin kultiviert und 4 h mit 60 $\mu$ M Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wurde eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wurde mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend der Angaben des Herstellers (Diagen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wurde in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wurde das Fusionsprotein einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).

Es zeigte sich, daß ein erfindungsgemäßes (Fusions)protein in hochreiner Form hergestellt werden kann.

30 **Beispiel 2: Herstellung und Nachweis eines erfindungsgemäßen Antikörpers**  
Ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 wurde einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M



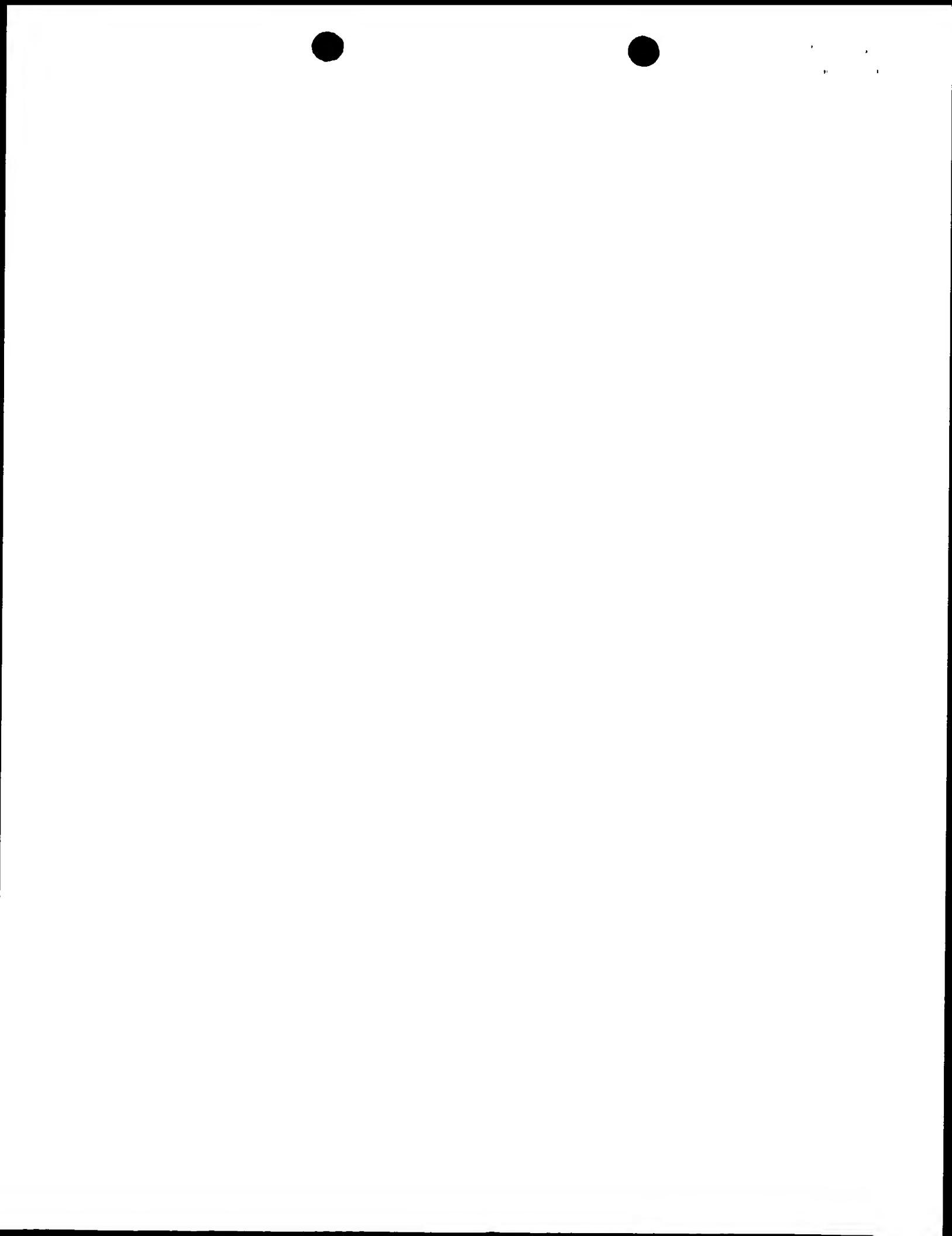
Natriumacetat wurde eine ca. 40 kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke wurden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgte, bestimmt wurde. Mit dem Gel-gereinigten Fusionsprotein wurden Tiere wie folgt immunisiert:

**Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen**

Pro Immunisierung wurden 35 $\mu$ g Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)  
Tag 14: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)  
Tag 28: 3. Immunisierung (icFA)  
Tag 56: 4. Immunisierung (icFA)  
15 Tag 80: Ausbluten

Das Serum des Kaninchens wurde im Immunoblot getestet. Hierzu wurde ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die Western Blot-Analyse wurde wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wurde das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper war das Serum des Kaninchens (1:10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wurde das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper war ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1:5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgten mehrere Waschschritte mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36 $\mu$ M 5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400 $\mu$ M Nitroblau-tetrazolium, 100mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar waren.



Es zeigte sich, daß erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.

**Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn**

5 Pro Immunisierung wurden 40 $\mu$ g Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)

Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)

10 Tag 50: 3. Immunisierung (icFA)

Aus Eigelb wurden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es wurden erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

15 **Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus**

Pro Immunisierung wurden 12 $\mu$ g Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung war das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

20 Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)

Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)

Tag 56: 3. Immunisierung (icFA)

Tag 84: 4. Immunisierung (PBS)

Tag 87: Fusion

25

Überstände von Hybridomen wurden im Western Blot getestet. Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper wurden nachgewiesen.

30

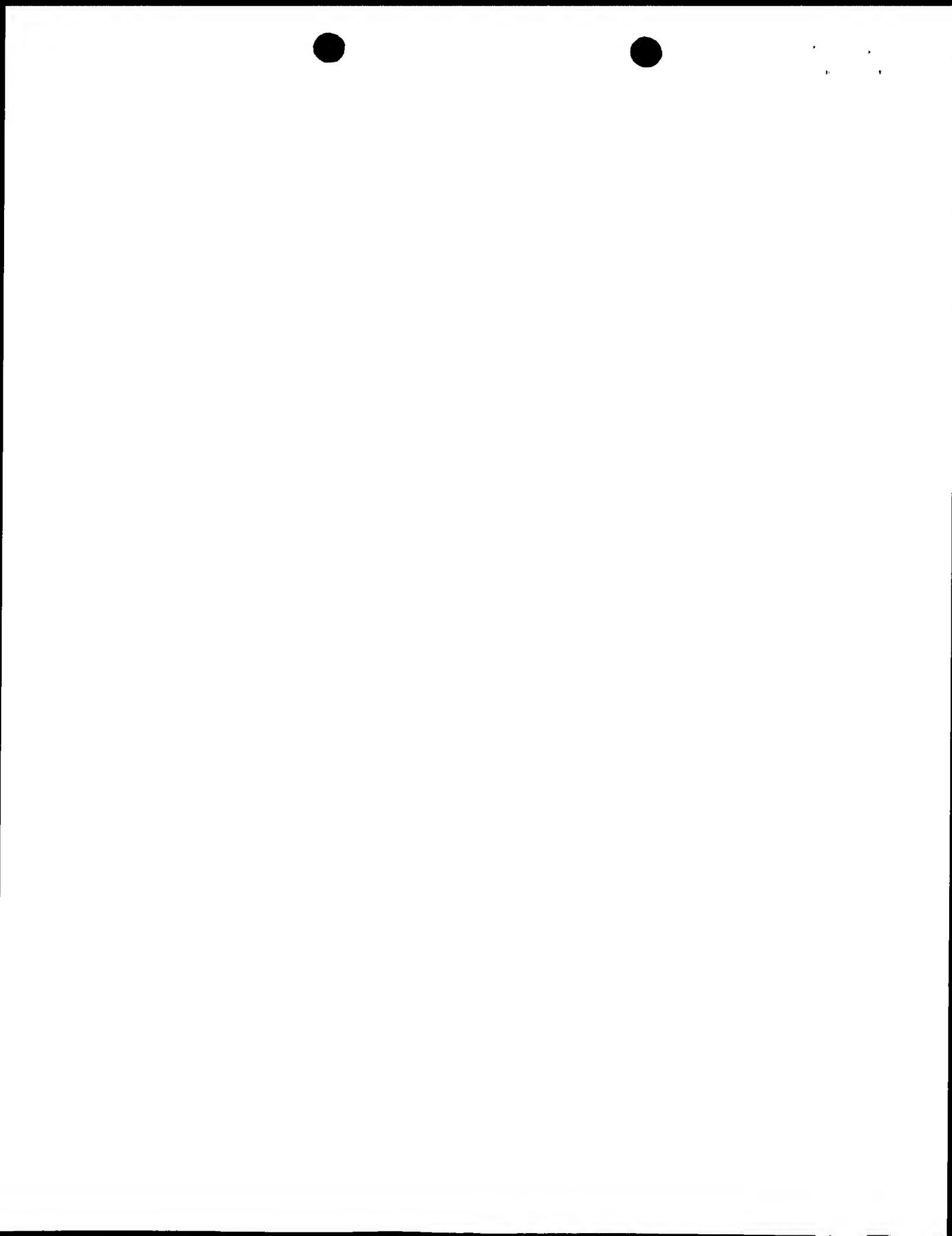
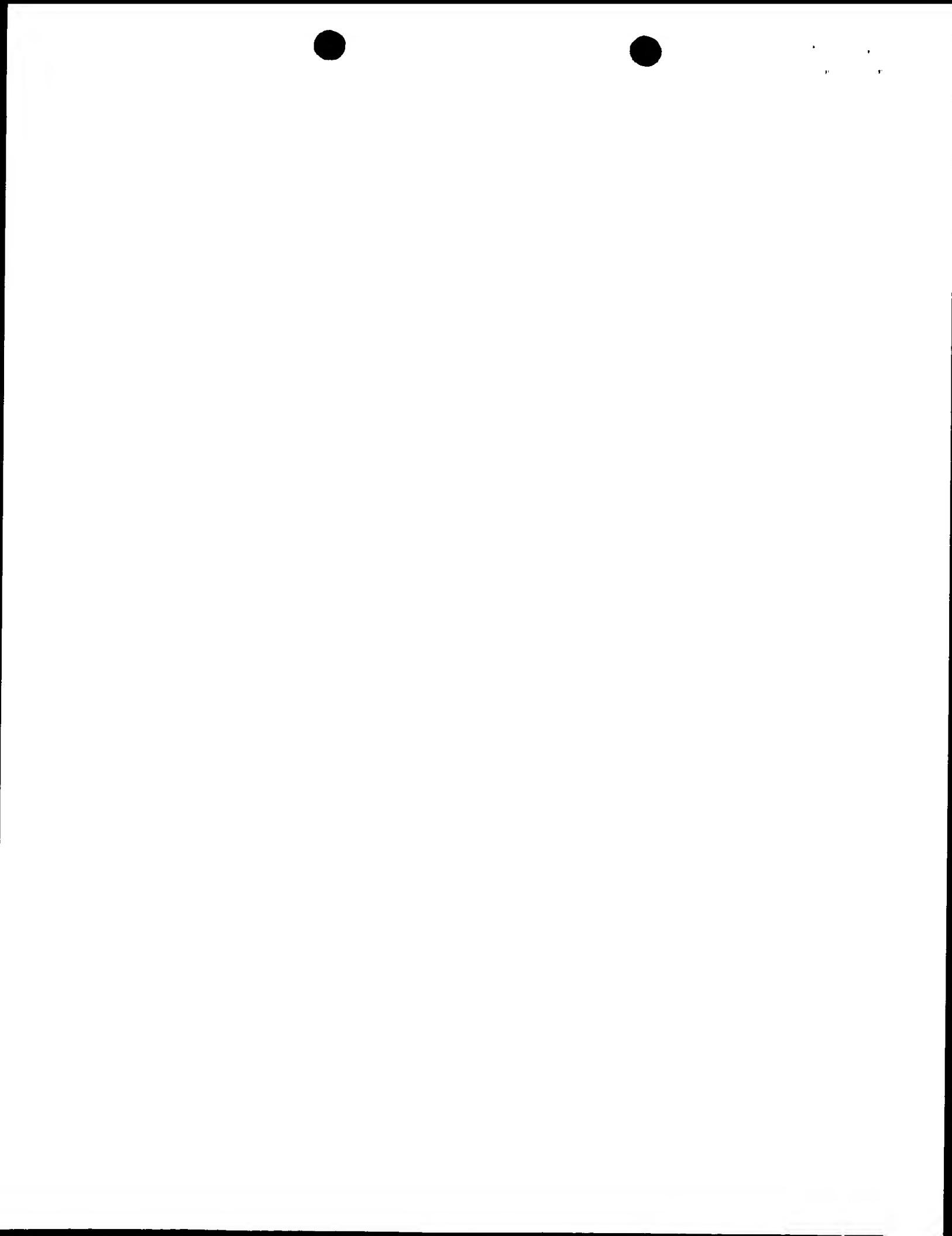


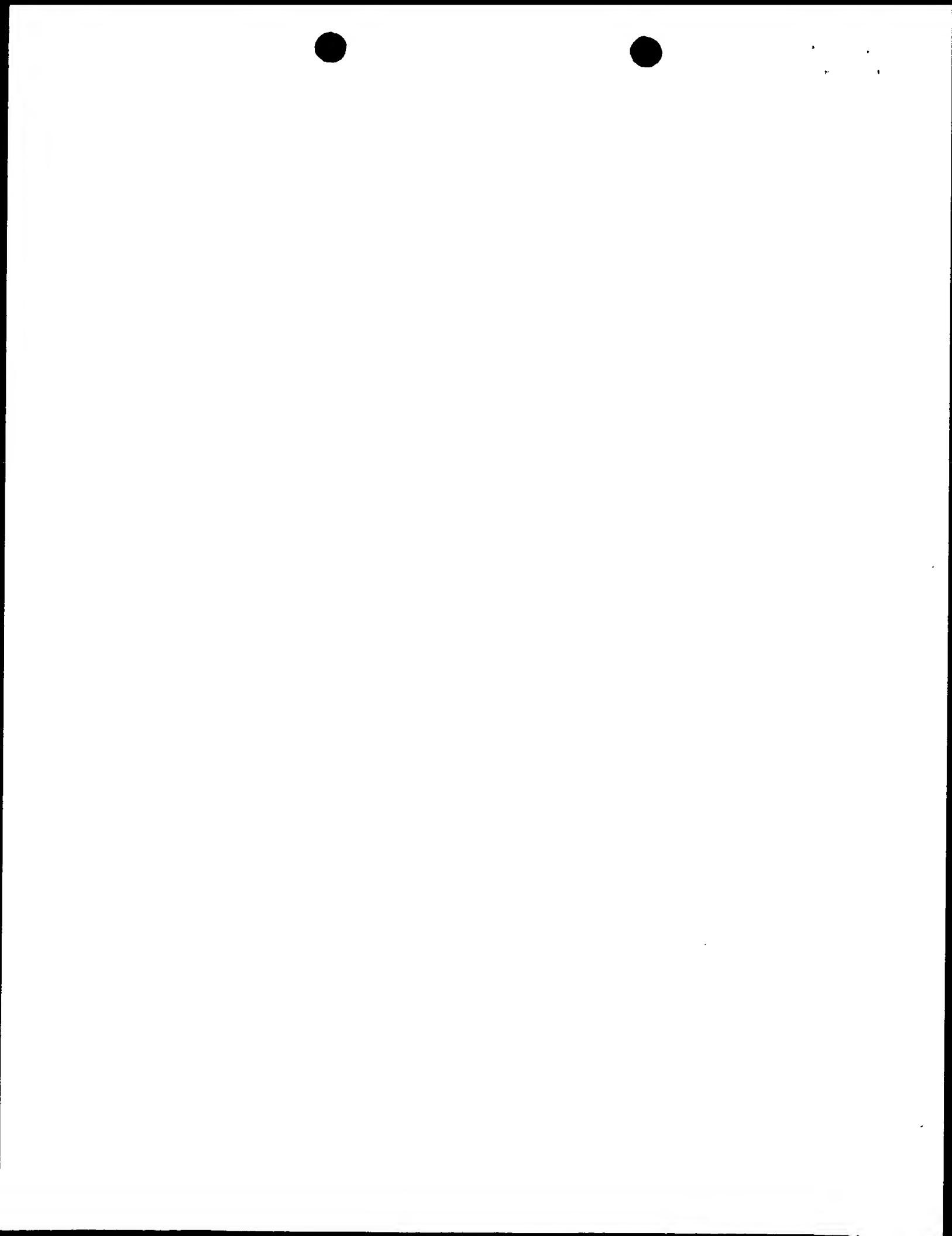
Tabelle 1: Expression von erfundungsgemäßen DNAs in Mäuseembryonen

	Dkk-1	Dkk-2	Dkk-3
<b>Neuroepithelium</b>			
E9.5 diencephalon	+++ ventral	+++ medial	+ medial
E12.5	telencephalon M/mantle	hypothalamus	telencephalon M/ventricular zone
Eye	pigmented epithelium	choroid	retina
Spinal cord	-/+	-	ventricular zone Roof plate
<b>Mesoderm:</b>			
Heart E10	bulbus cordis Endocardium	endothelium	myocardium
	septum transversum		
Heart E12	endocardial cushion	endothelium	endocardial cushion
Blood vessels	+++ aorta	+++ pulmonary artery	+++ aorta + pulmonary artery
Limb bud mesenchyme	E9 S	I	D
Bone E12	perichondrium	S/mesenchyme	perichondrium I/mesenchyme



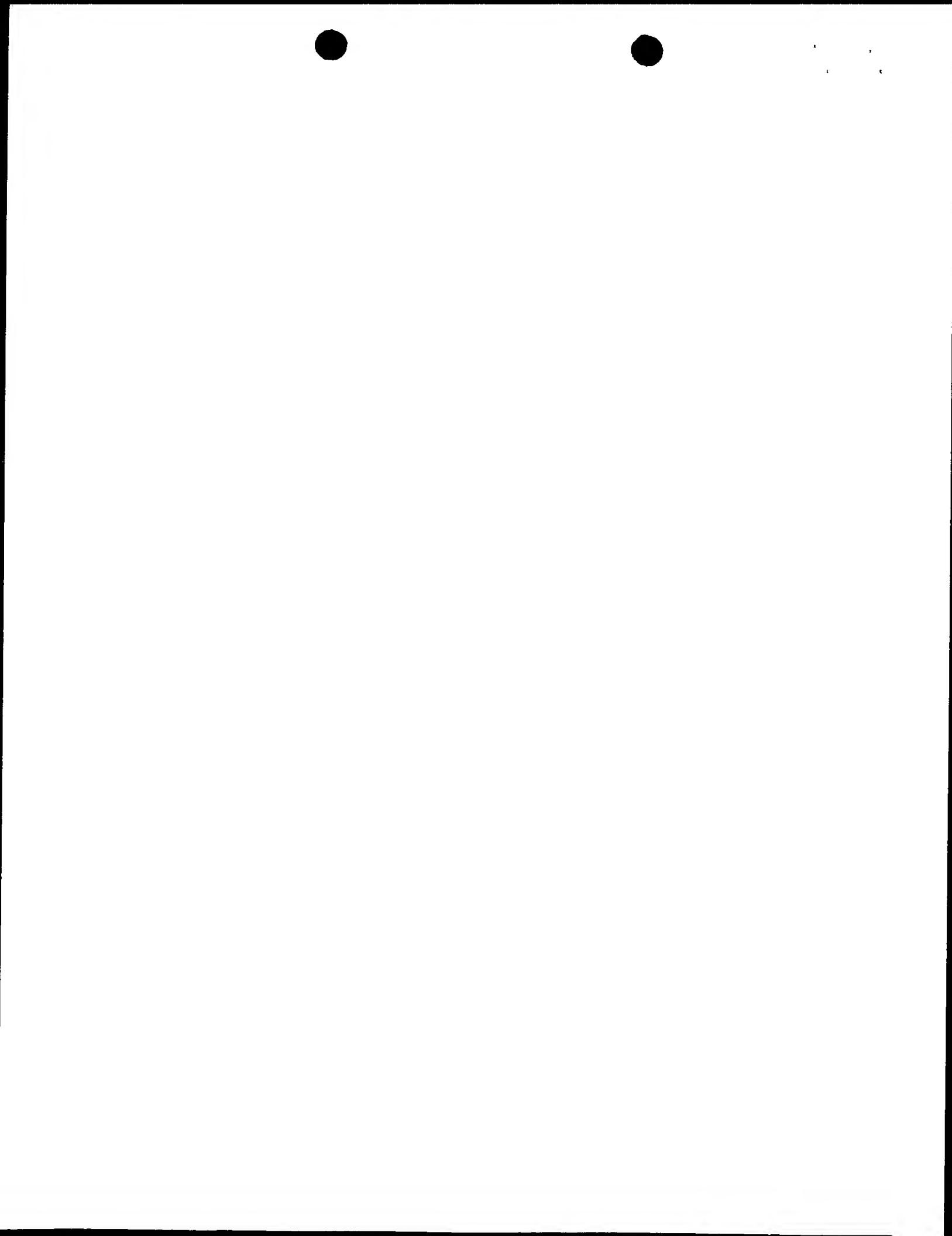
Bone E15	Ossification centers	
Urogenital	nephric duct S-shaped body Comma shaped body	metanephric mesenchyme
Palate	+++	++
Hair follicle	+++ mesenchyme + epithelium	+
Tooth mesenchyme	-	-
Trunk mesoderm	-/-	+++

Legende: Mesoderm: (D) deep, (I) intermediate (L) lateral, (M) medial, (S) superficial.  
Ausdrucksstärke: (-) absence, (+/-) very weak expression, (+) medium, (++) strong, (+++) very strong.

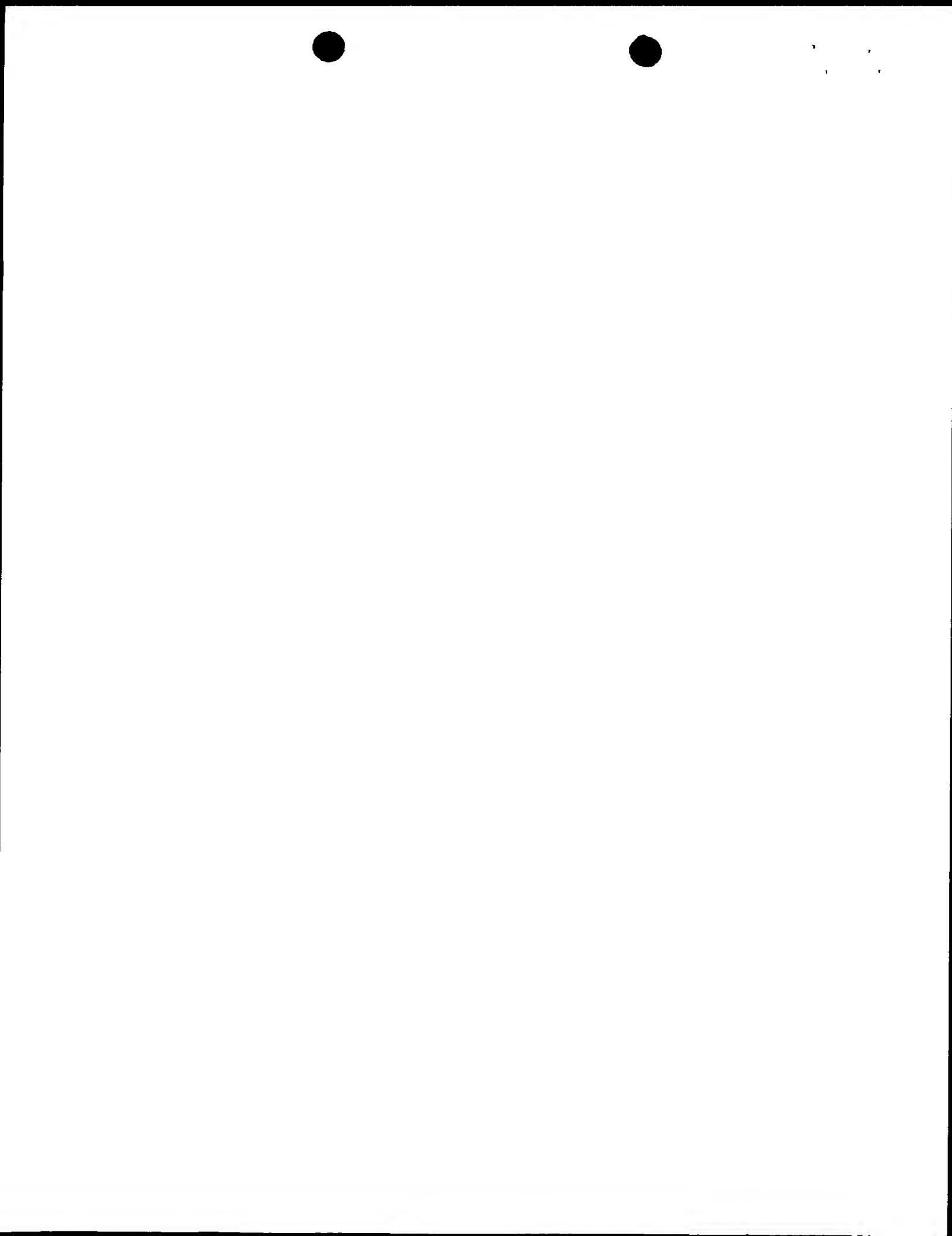


**Patentansprüche**

- 5        1. Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, wobei das Protein zumindest eine der in Fig. 1 angegebenen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II umfaßt.
- 10      2. Protein nach Anspruch 1, wobei das Protein die Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II umfaßt.
- 15      3. DNA, kodierend für das Protein nach Anspruch 1 oder 2.
- 20      4. DNA nach Anspruch 3, wobei die DNA umfaßt:
  - (a) die DNA von Fig. 2 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA,
  - (b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA oder
  - (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.
- 25      5. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 3 oder 4.
- 30      6. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 5.
- 25      7. Verfahren zur Herstellung des Proteins nach Anspruch 1 oder 2, umfassend die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 6 unter geeigneten Bedingungen.
- 30      8. Antikörper, gerichtet gegen das Protein nach Anspruch 1 oder 2.
- 30      9. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 oder 2 als Reagens zur Diagnose und/oder Therapie.



10. Verwendung der DNA nach Anspruch 3 oder 4 als Reagens zur Diagnose und/oder Therapie.



### Zusammenfassung

5

#### Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs,  
10 eine ein solches Protein kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines  
solchen Proteins. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des  
Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.

